



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Τοξικολογία

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μη χρωματογραφική μεθοδολογία ανίχνευσης νοθείας

σε προϊόντα Stevia

POST GRADUATE THESIS

Non- chromatographic detection of counterfeit Stevia products



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Ιωάννα Ποτηριάδη

Ioanna Potiriadi

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ και ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ/NAMES OF SUPERVISORS

Πέτρος Καρκαλούσος, Γεωργία Ελένη Τσότσου/

Petros Karkalousos, Georgia Eleni Tsotsou

Λάρισα/Larisa 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μη χρωματογραφική μεθοδολογία ανίχνευσης νοθείας
σε προϊόντα Stevia**

POST GRADUATE THESIS

Non- chromatographic detection of counterfeit Stevia products

Μέλη τριμελούς επιτροπής

κ. Πέτρος Καρκαλούσος	κ. Γεωργία Ελένη Τσότσου	κ. Δημήτριος Στάγκος
Επίκουρος καθηγητής	Εργαστηριακός Συνεργάτης,	Επίκουρος καθηγητής
Κλινικής Χημείας και	PhD	Φυσιολογίας Ζωικών
μεθόδων Ελέγχου		Οργανισμών
Ποιότητας		
Πανεπιστήμιο Δυτικής	Πανεπιστήμιο Δυτικής	Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Αττικής	Αττικής	

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

<Ιωάννα Ποτηριάδη>

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ.Πέτρο Καρκαλούσο και την κ.Γεωργία Τσότσου για τη δυνατότητα που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την εξαιρετική τους συμβολή σχετικά με την έγκαιρη εξασφάλιση των αναλώσιμων και του εξοπλισμού για τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της διπλωματικής εργασίας, για την απaráμιλλη προθυμία τους να εργαστούν για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας ακόμη και σε μη εργάσιμες ημέρες και πέραν της ολοκλήρωσης του ωραρίου τους και για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπό μου, επιτρέποντάς μου να εργαστώ στο ερευνητικό εργαστήριο του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών. Τους ευχαριστώ ειλικρινά για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας, καθώς χωρίς τη συμβολή τους δε θα είχα τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω ερευνητική διπλωματική εργασία στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα εκχυλίσματα του φυτού *Stevia* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γλυκαντικών προϊόντων χωρίς θερμιδικό περιεχόμενο, τα οποία είναι κατάλληλα για διαβητικά άτομα και δείχνουν να έχουν επιπρόσθετα οφέλη για την υγεία. Καθώς έχουν καταγραφεί φαινόμενα νοθείας με σκοπό το οικονομικό όφελος, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ευαίσθητων μεθόδων για την ανίχνευση νοθευτικών γλυκαντικών και την ποσοτικοποίηση των γλυκοζιτών της στεβιόλης.

Σκοπός-μέθοδος: Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μη χρωματογραφικής μεθοδολογίας για τον απλό και γρήγορο ποσοτικό προσδιορισμό του κύριου γλυκοζίτη της στεβιόλης, της ρεμπαουδιοσίδης A και του νοθευτικού γλυκαντικού, άλας της σακχαρίνης. Στα πλαίσια αυτής, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης A και επαληθεύτηκε βιβλιογραφική μέθοδος για τον προσδιορισμό της σακχαρίνης.

Αποτελέσματα: Η φωτομετρική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης A, βασίζεται στην όξινη υδρόλυσή της υπό θέρμανση έπειτα από απομάκρυνση τυχόν αρχικής ποσότητας γλυκόζης με κατεργασία με εξοκινάση και φωτομετρικό προσδιορισμό της απελευθερωμένης γλυκόζης, και επέδειξε ικανοποιητικά τεχνικά χαρακτηριστικά ($R^2 > 0.99$, γραμμική περιοχή: 0-1.5 mg/ml, LOQ: 0.39 ppm, bias <13% σε κάθε περίπτωση). Η μέθοδος ποσοτικοποίησης της σακχαρίνης μέσω φωτομετρικού προσδιορισμού σχηματιζόμενου ζεύγους ιόντων με τη χρωστική μπλε του μεθυλενίου επίσης έχει ικανοποιητικά τεχνικά χαρακτηριστικά ($R^2 > 0.99$, γραμμική περιοχή: 0-6 mg/ml, LOQ: 1.7 ppm), και επιτρέπει τον προσδιορισμό του νοθευτικού σε χαμηλότερη σχετική αναλογία σε σχέση με τη ρεμπαουδιοσίδα A (τουλάχιστον ως 0.1%) συγκριτικά με βιβλιογραφικές μεθόδους διερεύνησης νοθείας *Stevia*. Και οι δύο φωτομετρικές μέθοδοι μειονεκτούν, όμως, ως προς τη ειδικότητά τους. Τέλος, επαληθεύτηκε πρωτόκολλο HPLC/UV ταυτόχρονης ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης A και σακχαρίνης (R^2 γραμμικής συσχέτισης εμβαδού κορυφής/ συγκέντρωσης >0.99 και στις δύο περιπτώσεις και εύρος γραμμικής περιοχής μέχρι 0.8 και 1.2mg/ml αντίστοιχα). Πέραν της ειδικότητας, τα τεχνικά χαρακτηριστικά της μεθόδου HPLC/UV αποδείχθηκαν λιγότερο ικανοποιητικά σε σχέση με τη φωτομετρική μέθοδο της όξινης υδρόλυσης. Ανάλυση παλινδρόμησης

Pearson έδειξε θετική, γραμμική και στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών των δύο μεθόδων ($R: 0.9811$, $N=5$, $P < 0.0031$).

Συμπεράσματα: Οι φωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης Α και της σακχαρίνης που παρουσιάστηκαν είναι χρήσιμες για τον απλή, γρήγορη, χαμηλού κόστους και με ικανοποιητική ακρίβεια (τουλάχιστον ως προς τη ρεμπαουδιοσίδα Α), αρχική διερεύνηση της νοθείας πρώτων υλών προϊόντων Stevia. Κύριο πλεονέκτημα τους είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός της νοθείας σε πολύ μικρή σχετική αναλογία ως προς τη ρεμπαουδιοσίδα Α. Η φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης Α παρουσιάζει βελτιωμένα πολλά από τα τεχνικά χαρακτηριστικά σε σχέση με την εναλλακτική HPLC/UV μέθοδο. Το βασικό μειονέκτημα των συγκεκριμένων φωτομετρικών μεθόδων είναι η μικρή ειδικότητά τους, με αποτέλεσμα να είναι κατάλληλες για το αρχικό screening και να απαιτούν περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση σε περίπτωση εντοπισμού νοθείας.

Abstract

Background: Stevia plant extracts are used to produce non- caloric sweeteners that are safe for diabetic patients to consume and furthermore exhibit multiple health benefits. Since there have already been incidents of economic- based adulteration of Stevia products, it is deemed necessary that high- sensitivity methods for the quantification of Stevia glucosides and of the adulterants used are developed.

Purpose-Method: The purpose of this post- graduate thesis was to develop non- chromatographic methodology suitable for the fast and simple quantification of the major steviol glycoside, rebaudioside A and of the adulterant saccharin sodium. In this respect, a photometric method was developed and validated for the quantification of rebaudioside A and one bibliographic method was verified for the determination of saccharin sodium.

Results: The photometric method for the rebaudioside A determination relies on the acidic hydrolysis of rebaudioside A under heating and after treatment with hexokinase in order to remove any pre-existing glucose, and the subsequent photometric determination of the glucose released by the acidic hydrolysis. This method exhibited favorable technical characteristics ($R^2 > 0.99$, linearity: 0-1.5 mg/ml, LOQ: 0.39 ppm, bias <13% in all cases). The method for the saccharin quantification relies on the photometric determination of the ion pair formed with the methylene blue dye and also has desirable technical characteristics ($R^2 > 0.99$, linearity: 0-6 mg/ml, LOQ: 1.7 ppm), and allows the determination of the adulterant at a lower relative concentration to rebaudioside A (at least up to 0.1%) than bibliographic methods for the determination of Stevia adulterants. Both methods, however, exhibit low specificity. Lastly, an HPLC/ UV protocol was verified for the quantification of both rebaudioside A and saccharin (R^2 linear correlation of peak area/ concentration > 0.99). Besides specificity, the rest of the technical characteristics of the HPLC/UV method were less satisfactory compared to the photometric method of acidic hydrolysis. Pearson regression analysis showed positive, linear and statistically significant correlation between the results of the two methods (R : 0.9811, $N=5$, $P < 0.0031$).

Conclusions: The herein proposed photometric methodology for the quantification of saccharin and rebaudioside A respectively is useful for the simple,

fast, low- cost and with satisfactory precision initial testing of Stevia raw materials' adulteration. The major advantage of the photometric methods is the quantification of adulterants at a very low relative concentration to rebaudioside A. The photometric determination of rebaudioside A exhibits improved technical characteristics compared to the HPLC/UV method. The main drawback of the photometric methods is their low specificity, which makes them suitable only for the initial screening, and further chromatographic analysis is needed in case of detection of adulteration.

Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής.....	4
Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη	6
Abstract.....	8
Κατάλογος εικόνων.....	15
Κατάλογος πινάκων	17
Συντομογραφίες	19
Γενικό μέρος	21
1.Εισαγωγή	21
1.1Stevia	21
1.1.1 Χρήσεις και πηγές του φυτού Stevia	21
1.1.2 Οι γλυκοζίτες της στεβιόλης και η δομή τους	24
1.1.3 Φυτικοχημικές ιδιότητες των γλυκοζιτών στεβιόλης	27
1.1.4 Μεταβολισμός των γλυκοζιτών στεβιόλης	28
1.1.5 Εκτίμηση της ασφάλειας κατανάλωσης προϊόντων Stevia.....	29
1.1.6 Εκτίμηση της τοξικότητας των προϊόντων Stevia	30
1.1.7 Ευνοϊκές επιδράσεις των προϊόντων Stevia στην ανθρώπινη υγεία	33
1.1.8 Νοθεία προϊόντων Stevia	35
1.2 Μέθοδοι ανάλυσης για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων Stevia.....	36
1.2.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης A.....	38

1.2.2 Μεθοδολογία προσδιορισμού σακχαρίνης.....	41
1.2.3 HPLC Μεθοδολογία προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α και νοθευτικών γλυκαντικών	42
2. Πειραματικό μέρος	43
2.1 Υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α	43
2.1.1 Όξινη υδρόλυση	43
2.1.1.1 Υλικά	43
2.1.1.2 Μέθοδος.....	44
2.1.1.3 Αποτελέσματα.....	44
2.1.2 Ενζυματική υδρόλυση.....	45
2.1.2.1 Υλικά	45
2.1.2.2 Μέθοδος.....	46
2.1.2.3 Αποτελέσματα.....	47
2.1.3 Χημική αποικοδόμηση.....	50
2.1.3.1 Υλικά	50
2.1.3.2 Μέθοδος.....	51
2.1.3.3 Αποτελέσματα.....	51
2.1.4 Όξινη υδρόλυση σε υψηλή θερμοκρασία	53
2.1.4.1 Υλικά	53
2.1.4.2 Μέθοδοι	54
2.1.4.3 Αποτελέσματα.....	54

2.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου TLC για την ανίχνευση της ρεμπαουδιοσίδης Α και του προϊόντος της υδρόλυσής αυτής, γλυκόζης.....	58
2.2.1 Υλικά	58
2.2.2 Μέθοδοι	59
2.2.3 Αποτελέσματα.....	60
2.3 Πρόσθετες μέθοδοι προσδιορισμού της συγκέντρωσης ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση	63
2.3.1 Μέθοδος 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος.....	64
2.3.1.1 Υλικά	64
2.3.1.2 Μέθοδος.....	65
2.3.1.3 Αποτελέσματα.....	65
2.3.2 Μέθοδος χρωστικής Hanessian για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α	67
2.3.2.1 Υλικά	67
2.3.2.2 Μέθοδος.....	68
2.3.2.3 Αποτελέσματα.....	68
2.4 Διαχείριση προ υπάρχουσας γλυκόζης σε δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α προς ανάλυση.....	70
2.4.1 Διερεύνηση της σταθερότητας της γλυκόζης στις συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση	70
2.4.1.1 Υλικά	70
2.4.1.2 Μέθοδος.....	71
2.4.1.3 Αποτελέσματα.....	71

2.4.2 Απομάκρυνση συνυπάρχουσας γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης της γλυκόζης/ δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης	72
2.4.2.1 Υλικά	72
2.4.2.2 Μέθοδος.....	73
2.4.2.3 Αποτελέσματα.....	73
2.4.3 Απομάκρυνση συνυπάρχουσας γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης της γλυκόζης/ δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης και επακόλουθος ποσοτικός προσδιορισμός της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση.....	74
2.4.3.1 Υλικά	74
2.4.3.2 Μέθοδοι	75
2.4.3.3 Αποτελέσματα.....	76
2.5 Φωτομετρική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού σακχαρίνης.....	79
2.5.1 Υλικά	79
2.5.2 Μέθοδος.....	79
2.5.3 Αποτελέσματα.....	79
2.6 HPLC μεθοδολογία προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α και σακχαρίνης	83
2.6.1 Υλικά	83
2.6.2 Μέθοδος.....	83
2.6.3 Αποτελέσματα.....	83
2.8 Αποτελέσματα ανάλυσης εμπορικών προϊόντων Stevia.....	88
2.8.1 Υλικά	88
2.8.2 Μέθοδοι	89
2.8.3 Αποτελέσματα.....	89

Συμπεράσματα	93
Βιβλιογραφία	96

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Φύλλα και άνθη του φυτού <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni (Anniesremedy.com, 2019).....	23
Εικόνα 2: Δομές των κύριων γλυκοζιτών της στεβιόλης (Stothart, 2019)	25
Εικόνα 3: Δομή της στεβιόλης (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)	25
Εικόνα 4: Στοιχεία των γνωστών γλυκοζιτών της στεβιόλης (Prakash, Markosyan and Bunders, 2014)	26
Εικόνα 5: Δομή του άλατος της σακχαρίνης (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019).....	37
Εικόνα 6: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση με θέρμανση και ανάλυση με τη μέθοδο GOD/PAP.....	58
Εικόνα 7: Χρωματογράφημα ανεπτυγμένο με το προτεινόμενο πρωτόκολλο TLC με την κινητή φάση 1 και χρώση Hanessian. Η κηλίδα με το νούμερο 1 αντιστοιχεί στη γλυκόζη και η κηλίδα με το νούμερο 2 αντιστοιχεί στη ρεμπαουδιοσίδα Α	63
Εικόνα 8: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση με θέρμανση και ανάλυση με τη χρωστική Hanessian.....	69
Εικόνα 9: Μείωση συγκέντρωσης γλυκόζης σε συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση (1: νερό, 2: μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, 3: ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v).....	72
Εικόνα 10: Μείωση συγκέντρωσης γλυκόζης έπειτα από επώαση με κιτ εξοκινάσης (1: νερό, 2: μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, 3: ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v)	74
Εικόνα 12: Καμπύλη αναφοράς μεταξύ της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α και του παρατηρούμενου σήματος έπειτα από επώαση των δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης, όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση και ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο GOD/PAP..	78
Εικόνα 13: Καμπύλη αναφοράς των αρχικών αποτελεσμάτων του φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης.....	80

Εικόνα 14: Καμπύλη αναφοράς των τελικών αποτελεσμάτων του φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης.....	82
Εικόνα 15: Καμπύλη αναφοράς για τον HPLC προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α ..	86
Εικόνα 16: Καμπύλη αναφοράς για τον HPLC προσδιορισμό της σακχαρίνης	86
Εικόνα 17: Αριστερά παρουσιάζεται η χρωματογραφική κορυφή της σακχαρίνης με χρόνο κατακράτησης 8.9 και δεξιά το φάσμα απορρόφησης της σακχαρίνης	87
Εικόνα 18:Αριστερά παρουσιάζεται η χρωματογραφική κορυφή της ρεμπαουδιοσίδης Α με χρόνο κατακράτησης 4.8 και δεξιά το φάσμα απορρόφησης της ρεμπαουδιοσίδης Α....	88
Εικόνα 19: Γραμμική συσχέτιση αποτελεσμάτων φωτομετρικής και χρωματογραφικής μεθόδου προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α.....	92

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Χημική ταυτότητα κύριων γλυκοζιτών στεβιόλης (Gupta et al, 2016).....	24
Πίνακας 2: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα της διερεύνησης της όξινης υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α.....	45
Πίνακας 3: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα για την ενζυματική υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α	50
Πίνακας 4: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα για την οξειδωτική υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α	53
Πίνακας 5: Σύγκριση παρατηρούμενου σήματος της υδρόλυσης σε κάθε διαλύτη. Η μπάρα 1 αντιστοιχεί στο διαλύτη ακετονιτριλίου, η 2 ^η στο μεθανολικό διαλύτη και η 3 ^η στον υδατικό διαλύτη.....	55
Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις δειγμάτων για τη διερεύνηση της γραμμικής συσχέτισης συγκέντρωσης ρεμπαουδιοσίδης Α και ανίχνευσης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP έπειτα από όξινη υδρόλυση και θέρμανση	56
Πίνακας 7: Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α υπό θέρμανση.....	57
Πίνακας 8: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα για την ανάπτυξη TLC πρωτοκόλλου προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α και γλυκόζης.....	61
Πίνακας 9: Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α με τη μέθοδο του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος.....	67
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α με όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση και τη χρωστική Hanessian.....	69
Πίνακας 11: Αποτελέσματα σταθερότητας γλυκόζης σε όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση	71
Πίνακας 12: Αποτελέσματα σταθερότητας γλυκόζης έπειτα από επώαση με κιτ εξοκινάσης.....	73
Πίνακας 14: Αποτελέσματα προσδιορισμού γλυκόζης έπειτα από επώαση 45 λεπτών με το διάλυμα εργασίας εξοκινάσης.....	76

Πίνακας 15: Αποτελέσματα προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από επώαση σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης και όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση και ποσοστό υδρόλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α σε υδατικά διαλύματα.....	77
Πίνακας 16: Αποτελέσματα προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από επώαση σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης και όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση σε υδατικά διαλύματα	77
Πίνακας 17: Τιμές απορρόφησης blank δείγματος, μέσος όρος και τυπική απόκλιση τους για τον υπολογισμό των LOD, LOQ	78
Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις σακχαρίνης και αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης.....	80
Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις σακχαρίνης και τελικά αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης.....	81
Πίνακας 20: Τιμές απορρόφησης blank δείγματος, μέσος όρος και τυπική απόκλιση τους για τον υπολογισμό των LOD, LOQ	82
Πίνακας 21 : Χρόνοι ανάσχεσης αναλυτών έπειτα από ανάλυση με τις προτεινόμενες κινητές φάσεις	84
Πίνακας 22: Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α και σακχαρίνης	85
Πίνακας 23: Αποτελέσματα φωτομετρικής ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α σε εμπορικά δείγματα.....	90
Πίνακας 24: Αποτελέσματα HPLC/UV ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α εμπορικών δειγμάτων	91
Πίνακας 25: Αποτελέσματα φωτομετρικής ανάλυσης σακχαρίνης σε εμπορικά δείγματα	92

Συντομογραφίες

JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	Κοινή Επιτροπή Ειδικών Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας και Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας σχετικά με τα Πρόσθετα Τροφίμων
FAO	Food and Agriculture Organization	Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
FDA	Food and Drug Association	Σύνδεσμος Τροφίμων και Φαρμάκων
WHO	World Health Organisation	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
DSEA	Dietary Supplement Education Association	Σύνδεσμος Εκπαίδευσης για Συμπληρώματα Διατροφών
ADI	Acceptable Daily Intake	Αποδεκτή Ημερήσια Δόση
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Ασφάλειας Τροφίμων
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	Δόση στην οποία δεν παρατηρείτε δυσμενής επίδραση
PEP	Phosphoenolpyruvate	Φωσφονοενλοπυροσταφυλικό
CAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling	Τερματική σήμανση δεοξυνουκλεοτιδύλ τρανσφεράσης
HPLC/UV	High Pressure Liquid Chromatography / Ultra Violet	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/ Υπεριώδους
UV/vis	Ultraviolet / visible	Υπεριώδες/ Ορατό
LOD	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης

LOQ	Limit of Quantification	Όριο ποσοτικοποίησης
-----	-------------------------	----------------------

Γενικό μέρος

1.Εισαγωγή

1.1Stevia

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ο αριθμός των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη τύπου II έχει αυξηθεί από 108 εκατομμύρια (4.7% του πληθυσμού των ενηλίκων) το 1980 σε 422 εκατομμύρια (8.5% του ενήλικου πληθυσμού) το 2014. Παράλληλα, για το 2016 ο αριθμός των θανάτων για τους οποίους ευθύνεται αποκλειστικά ο διαβήτης τύπου II εκτιμάται στα 1.6 εκατομμύρια(Who.int, 2018). Η παγκόσμια διάδοση της παχυσαρκίας έχει σχεδόν τριπλασιαστεί από το 1975. Επιπρόσθετα, εκτιμάται πως το 13% των ενηλίκων το 2016 ήταν παχύσαρκοι(Who.int, 2018). Οι καταστροφικές επιπτώσεις της παχυσαρκίας και των διαταραχών του μεταβολισμού που σχετίζονται με το αυξημένο βάρος υπογραμμίζουν την ανάγκη για στροφή στην κατανάλωση γλυκαντικών προϊόντων χωρίς υδατάνθρακες και θερμιδικό περιεχόμενο.

1.1.1 Χρήσεις και πηγές του φυτού Stevia

Σε αυτήν την κατηγορία γλυκαντικών, ανήκουν και τα προϊόντα του φυτού Stevia. Τα φυτικά αυτά προϊόντα δεν περιέχουν θερμίδες και είναι ασφαλή για κατανάλωση από διαβητικούς ασθενείς, καθώς δείχνουν να έχουν και ορισμένες γλυκορυθμιστικές ιδιότητες (Anton et al, 2010). Επιπρόσθετα, στοιχεία της βιβλιογραφίας καταδεικνύουν πως έχουν πιθανή αντί-υπεργλυκαιμική, αντί-νεοπλαστική, αντικαρκινική, αντιυπερτασική, αντιφλεγμονώδη (Chatsudthipong and Muanprasat, 2009) και αντιοξειδωτική δράση (Shivanna et al, 2013). Από την επιτροπή JECFA, έχουν οριστεί προδιαγραφές που επισημαίνουν πως τα εμπορικά γλυκαντικά προϊόντα της Stevia, θα πρέπει να αποτελούνται τουλάχιστον κατά 95% από γνωστούς γλυκοζίτες της στεβιόλης (JECFA, 2016).

Η χρήση προϊόντων Stevia ως γλυκαντικά έχει ήδη εγκριθεί στην Ευρωπαϊκή ένωση, τις ΗΠΑ, την Κίνα, την Ιαπωνία, την Κορέα, τη Βραζιλία και τη Ρωσία (Kinghorn and Soejarto, 1985). Τα γλυκαντικά Stevia χρησιμοποιούνται ήδη σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως η σάλτσα σόγιας, θαλασσινά προϊόντα, λαχανικά

τουρσί, είδη αρτοποιίας και ζαχαροπλαστικής, αλλά και αλκοολούχα ποτά, αναψυκτικά, ροφήματα καφέ και τσαγιού, συμπληρώματα διατροφής, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά (Nabors, 2001). Τα παρασκευάσματα αυτών των γλυκαντικών διατίθενται στην αγορά κυρίως σε μορφή κρυσταλλικής, λευκής σκόνης ή διαυγών διαλυμάτων, τα οποία συνήθως περιέχουν τα γλυκαντικά της Stevia σε κατάλληλη συγκέντρωση ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ίδια αναλογία με τη συμβατική ζάχαρη, για παράδειγμα μία-δύο κουταλιές σε μια κούπα καφέ. Εναλλακτικά, διατίθενται σε συνδυασμό με άλλες γλυκαντικές ουσίες με ηπιότερη γλυκιά γεύση, όπως η ερυθριτόλη.

Το φυτό Stevia αποτελεί είδος ξυλώδους, άμισχου, πολυετούς (Hata, Yomo and Fujita, 2001) θάμνου, της οικογένειας *Asteraceae* (Compositae). Ένα πλήρως ώριμο φυτό μπορεί να φτάσει σε ύψος ως και 65 εκατοστά (Sreedhar et al, 2008). Είναι ενδημικό είδος στη Βραζιλία και την Παραγουάη (Gupta et al, 2016). Ωστόσο, έπειτα από την αύξηση του εμπορικού ενδιαφέροντος σχετικά με το φυτό, η παραγωγή του σε μεγάλη κλίμακα έχει επεκταθεί και στην Ιαπωνία, την Ταϊβάν, την Κορέα και την Ταϊλάνδη. Η καλλιέργειά του δε χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα απαιτητική. Ως ημιτροπικό φυτό χρειάζεται μέσα επίπεδα υγρασίας, αμμώδες κοκκινόχωμα με καλή αποστράγγιση και pH σε εύρος 6,6-7,5 (Ramesh, Singh and Mereji, 2006).



Εικόνα 1: Φύλλα και άνθη του φυτού *Stevia rebaudiana* Bertoni (Anniesremedy.com, 2019)

Το γένος *Stevia* αποτελείται από τουλάχιστον 110 είδη, αν και είναι πιθανό να υπάρχουν και πάνω από 300 (Caracostas et al, 2008). Από τα παραπάνω είδη, τα οποία περιέχουν διαφορετικές δυνητικά γλυκαντικές ενώσεις, εκείνο με την ισχυρότερη γλυκαντική ικανότητα είναι το φυτό με την πλήρη ονομασία *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ramesh, Singh and Megeji, 2006), το οποίο πήρε το όνομά του από τον βοτανολόγο Moises Santiago Bertoni ο οποίος πρώτος το κατέταξε (Gupta et al, 2016). Η γλυκιά γεύση των φυτικών εκχυλισμάτων *Stevia* οφείλεται στην παρουσία των διτερπενοειδών γλυκοζιτών που περιέχονται κυρίως στα φύλλα του φυτού. Μία μικρή ποσότητα περιέχεται στο στέλεχος, ενώ στις ρίζες η ποσότητα των γλυκοζιτών που τυχόν περιέχεται είναι μη ανιχνεύσιμη (Pol, Hohnova and Hyotylainen, 2007). Οι δύο κυριότεροι γλυκοζίτες του φυτού είναι η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη Α, καθώς συνιστούν το 3 ως 8% του ξηρού βάρους των φύλλων (Gupta et al, 2016) και τουλάχιστον 90% του βάρους όλων των γλυκοζιτών που εντοπίζονται στα φύλλα του φυτού (Bergs et al, 2012).

[Γλυκοζίτες](#)

[Χημική](#)

[Συντακτικός](#)

[Μοριακό](#)

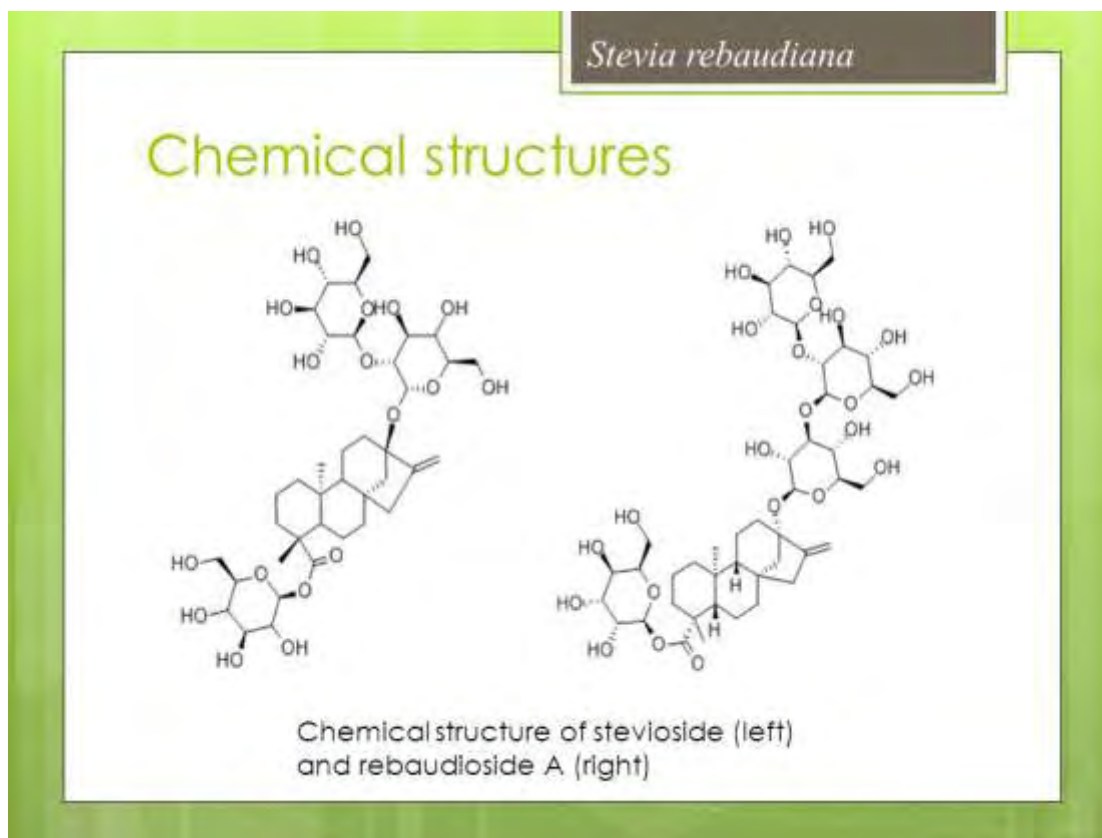
[Αριθμός](#)

<u>Στεβιόλης</u>	<u>Ονομασία</u>	<u>Τύπος</u>	<u>Βάρος</u>	<u>C.A.S.</u>
<u>Στεβιοσίδη</u>	<u>13-[(2-O-β-d- γλυκοπυρανοσυλ-β-d- γλυκο- πυρανοσυλ)οξύ]καουρ- 16-εν-18-οϊκό οξύ β-d- γλυκοπυρανοσυλ εστέρας</u>	<u>C₃₈H₆₀O₁₈</u>	<u>804.88</u>	<u>57817-89- 7</u>
<u>Ρεμπαουδιοσίδη Α</u>	<u>13-[(2-O-β-d- γλυκοπυρανοσυλ-3-O- β-d-γλυκοπυρανοσυλ-β- d-γλυκοπυρανοσυλ)- οξύ]καουρ-16-εν-18- οϊκό οξύ β-d- γλυκοπυρανοσυλ εστέρας</u>	<u>C₄₄H₇₀O₂₃</u>	<u>967.03</u>	<u>58543-16- 1</u>

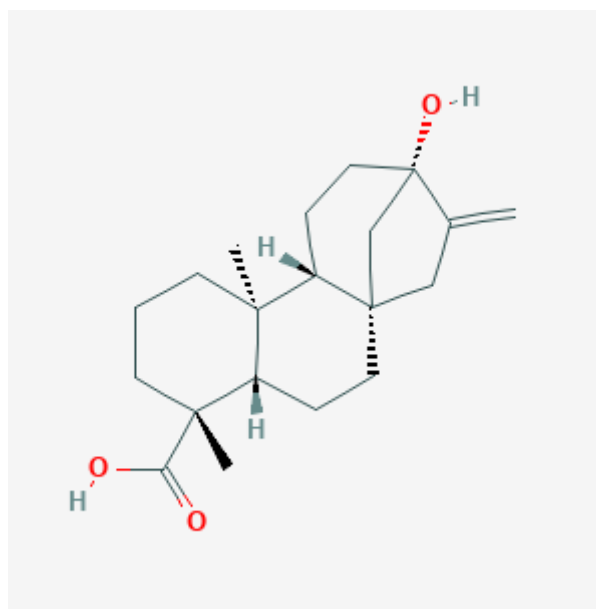
Πίνακας 1: Χημική ταυτότητα κύριων γλυκοζιτών στεβιόλης (Gupta et al, 2016)

1.1.2 Οι γλυκοζίτες της στεβιόλης και η δομή τους

Πέραν από τους δύο κύριους γλυκοζίτες στεβιοσίδη και ρεμπαουδιοσίδη Α, έχουν ταυτοποιηθεί ακόμη αρκετοί δευτερεύοντες γλυκοζίτες, όπως η ρεμπαουδιοσίδη Β ως G, δουλκοσίδη Α, στεβιολβιοσίδη και ρουμποσοσίδη (Richman et al, 1999), (Rajasekaran et al, 2008), (Goyal and Samsheer, 2010). Οι γλυκοζίτες που απομονώνονται από το φυτό *Stevia* ονομάζονται συνοπτικά και γλυκοζίτες της στεβιόλης. Η δομή αυτών των γλυκοζιτών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός σκελετού διτερπενίου καουρέν συνδεδεμένο με διαφορετικό αριθμό μονάδων γλυκόζης για τους διαφορετικούς γλυκοζίτες. Το τμήμα της αγλυκόνης αυτών των γλυκοζιτών ονομάζεται στεβιόλη και είναι η ένωση 13-υδρόξυ καούρ-16-εν-19 οϊκό οξύ.



Εικόνα 2: Δομές των κύριων γλυκοζιτών της στεβιόλης (Stothart, 2019)



Εικόνα 3: Δομή της στεβιόλης (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)

Sweetener	Reference Number in Text	R-Groups in Backbone Figure Above		Formula	Molecular Weight (g/mol)	Potency *
		R ₁	R ₂			
Rebaudioside A	1	β-glc-	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967.01	200
Rebaudioside B	2	H	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.88	150
Rebaudioside C	3	β-glc-	(β-glc, α-rha)-β-glc-	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	951.01	30
Rebaudioside D	4	β-glc-β-glc-	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	1129.15	221
Rebaudioside E	5	β-glc-β-glc-	β-glc-β-glc-	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967.01	174
Rebaudioside F	6	β-glc-	(β-glc, β-xyl)-β-glc-	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	936.99	200
Rebaudioside M	7	(β-glc) ₂ -β-glc-	(β-glc) ₂ -β-glc-	C ₅₆ H ₉₀ O ₃₃	1291.3	250
Stevioside	8	β-glc-	β-glc-β-glc-	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.88	210
Steviolbioside	9	H	β-glc-β-glc-	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642.73	90
Rubusoside	10	β-glc-	β-glc-	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642.73	114
Dulcoside A	11	β-glc-	α-rha-β-glc-	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	788.87	30

glc = glucose; rha = rhamnose; xyl = xylose; * Potency from [1,6,7].

Εικόνα 4: Στοιχεία των γνωστών γλυκοζιτών της στεβιόλης (Prakash, Markosyan and Bunders, 2014)

Η στεβιόλη συμμετέχει στο σχηματισμό του C19- εστερικού δεσμού μεταξύ της C19-καρβοξυλομάδας και μιας μονάδας γλυκόζης. Επιπλέον σχηματίζει αιθερικούς δεσμούς μεταξύ της C13- υδροξυλομάδας του με μονάδες γλυκόζης, ξυλόζης και ραμνόζης. Στη στεβιοσίδη, τα γλυκοζύλ- και σοφοροσυλ- τμήματα συνδέονται με τη στεβιόλη σχηματίζοντας τον σκελετό κυκλοπεντανούπερυδροφαινανθρενίου. Συγκεκριμένα, οι C3 και C4 συνδέονται με τη β-γλυκοζυλομάδα και β-σοφοροσυλομάδα. Η δομή της ρεμπαουδιοσίδης A διαφέρει από της στεβιοσίδης στο ότι στη θέση του σοφοροσύλ τμήματος υπάρχει ένα γλυκοζύλ-(1-3)-σοφοροσύλ-τμήμα.

Πιο συγκεκριμένα, το βιοσυνθετικό μονοπάτι των γλυκοζιτών της στεβιόλης περιλαμβάνει 16 στάδια, τα οποία καταλύονται κυρίως από 4 UDP-γλυκοτρανσφεράσες, τις UGT85C2, UGT74G1, UGT76G1 και την 13-υδροξυλάση του καουρενοϊκού οξέος (Yadav and Guleria, 2012). Τα 7 πρωταρχικά βήματα της βιοσύνθεσης των γλυκοζιτών της στεβιόλης είναι όμοια με το μονοπάτι της 2-C-μεθυλ-4-φωσφορικής-6-ερυθριτόλης κατά τη σύνθεση του διφωσφορικού ισο-πεντενυλεστέρα, του διφωσφορικού διμεθυλαλλυλστέρα και του διφωσφορικού γερανυλγερανύλ (Wanke, Tudek and Swiezewska 2001). Τα επόμενα 4 βήματα είναι όμοια με το βιοσυνθετικό μονοπάτι του γιββερελλικού οξέος και περιλαμβάνει τη σύνθεση καουρενοϊκού οξέος από διφωσφορικό γερανυλγερανύλ (Humphrey et al, 2006). Τα 5 τελικά βήματα οδηγούν στη βιοσύνθεση των γλυκοζιτών της στεβιόλης (Hanson and White, 1968).

Παρουσία της συνθάσης του διφωσφορικού δις-κοβαλλυλίου, το διφωσφορικό γερανυλγερανύλ αρχικά μετατρέπεται σε (-)-κοβαλλύλιο διφωσφορικό μέσω κυκλοποίησης που ξεκινά από πρωτονίωση. Στη συνέχεια, η καουρέν συνθάση παράγει καουρέν μέσω κυκλοποίησης εξαρτώμενης από ιονισμό του διφωσφορικού δις-κοβαλλυλίου. Επιπλέον, μέσω μιας αντίδρασης 3 βημάτων το καουρέν οξειδώνεται σε καουρενοϊκό οξύ από μία νέα καουρέν οξειδάση (Helliwell et al, 1999). Τέλος, η υδροξυλίωση του καουρενοϊκού οξέος παράγει στεβιόλη με τη δράση της 13-υδροξυλάσης του καουρενοϊκού οξέος (Brandle and Telmer, 2007), (Kim, Sawa and Shibata, 1996).

Στο κυτταρόπλασμα, η στεβιόλη γλυκοσυλιώνεται από διάφορες γλυκοσυλτρανσφεράσες. Η γλυκοσυλίωση ξεκινά στη C13 υδροξυλομάδα από το ένζυμο UGT85C2, παράγοντας στεβιόλη η οποία σχηματίζει στεβιολμονοσίδη. Η στεβιολβιοσίδη σχηματίζεται με γλυκοσυλίωση της στεβιολμονοσίδης, αλλά η γλυκοσυλτρανσφεράση η οποία καταλύει αυτό το βήμα δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί. Τέλος, με γλυκοσυλίωση της στεβιολβιοσίδης στη C19 θέση από την UGT74G1 σχηματίζεται στεβιοσίδη (Shibata et al, 1991). Η ρεμπαουδιοσίδη Α συντίθεται με γλυκοσυλίωση της στεβιοσίδης στη C13 θέση, η οποία καταλύεται από την UGT76G1 (Brandle and Telmer, 2007).

1.1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των γλυκοζιτών στεβιόλης

Οι γλυκοζίτες της στεβιόλης συναντώνται συνήθως σε μορφή κρυσταλλικής σκόνης με λευκό ή ελαφρώς κιτρινωπό χρώμα, χωρίς οσμή. Οι γλυκοζίτες αυτοί είναι ιδιαίτερα διαλυτοί σε νερό και σε αιθανόλη, για αυτό και συνήθως εκχυλίζονται είτε σε υδατικά διαλύματα ή σε διαλύματα με κάποια αναλογία νερού/ αιθανόλης (Mathur et al, 2017). Τα φυτικά εκχυλίσματα του φυτού Stevia περιέχουν επιπλέον ταννίνες, φλαβονοειδή, τριτερπένια και αιθέρια έλαια (Phillips, 1987). Οι ενώσεις των γλυκοζιτών παραμένουν σταθερές σε τιμές pH μεταξύ 2-10. Επιπλέον, σε όξινα διαλύματα δεν αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά των τροφίμων, ούτε προκαλούν αλλαγή στο χρώμα εκείνων που βρίσκονται σε μορφή διαλύματος. Παράλληλα, εντός των τιμών pH που απαντώνται στα τρόφιμα, οι γλυκοζίτες παραμένουν σταθεροί σε θερμοκρασία ως 200 °C, ενώ τα διαλύματά τους δε χάνουν τη γλυκιά τους γεύση ούτε έπειτα από θέρμανση στους 95 °C για 2 ώρες. Επιπρόσθετα, οι γλυκοζίτες της στεβιόλης δεν υπόκεινται σε ζύμωση (Abdullateef and Osman, 2012).

Οι γλυκοζίτες της στεβιόλης έχουν 100 ως 300 φορές πιο γλυκιά γεύση από τη σακχαρόζη (Allam, Nassar and Besheite 2001), (Mantovaneli et al, 2004) (Debnath, 2008). Επιπλέον, η γλυκιά τους γεύση έχει χαρακτηριστεί ανώτερη ως προς την ηπιότητα και τη φρεσκάδα, ενώ η γλυκιά τους επίγευση διαρκεί για περισσότερη ώρα από ότι της σακχαρόζης. Ωστόσο, δεν παρουσιάζουν όλοι οι γλυκοζίτες στεβιόλης εξίσου ευχάριστο γευστικό προφίλ. Έχει σημειωθεί πως πολλά προϊόντα Stevia που έχουν κυκλοφορήσει παρουσίασαν μια δυσάρεστη, πικρή, μεταλλική επίγευση η οποία μοιάζει με τη γεύση της γλυκόριζας. Η δυσάρεστη γεύση οφείλεται κυρίως στην παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης στεβιοσίδης (Kinghorn et al, 2010). Αντίθετα, η ρεμπαουδιοσίδη Α είναι ο γλυκοζίτης ο οποίος έχει τα λιγότερο δριμεία, στυπτικά και πικρά στοιχεία γεύσης, ενώ δεν παρουσιάζει επίμονη επίγευση (Marcinek and Krejpcio, 2015). Για αυτό το λόγο, τα εμπορικά προϊόντα Stevia είναι εμπλουτισμένα σε ρεμπαουδιοσίδη Α και περιέχουν στεβιοσίδη σε μικρή μόνο αναλογία με άλλους γλυκοζίτες με περισσότερο ευχάριστο γευστικό προφίλ.

1.1.4 Μεταβολισμός των γλυκοζιτών στεβιόλης

Τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα, η στεβιοσίδη και η ρεμπαουδιοσίδη Α μεταβολίζονται ασφαλώς και αποβάλλονται μέσω παρόμοιων μονοπατιών (Roberts and Renwick, 2008). Η στεβιοσίδη δεν απορροφάται στο λεπτό έντερο, λόγω του μεγάλου μοριακού της βάρους. Επιπλέον, τα ένζυμα της πέψης τα οποία δρουν στο γαστρεντερικό σωλήνα δεν έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν τη στεβιοσίδη σε στεβιόλη (Hutapea et al, 1997). Αντίθετα, η στεβιοσίδη διασπάται από τη βακτηριακή μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου παράγοντας ελεύθερη στεβιόλη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται στο γλυκουρονίδιο της στεβιοσίδης στο ήπαρ και αποβάλλεται από το σώμα μέσω των ούρων (Geuns et al, 2007), (Chatsudthipong and Muanprasat, 2009).

Η ρεμπαουδιοσίδη Α μεταβολίζεται από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα στο κόλον σε στεβιοσίδη, με αποτέλεσμα ο μετέπειτα μεταβολισμός ~~της~~ να ακολουθεί τα ίδια βήματα. Τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού είναι η στεβιόλη και η γλυκόζη. Το βακτήριο του γένους *Bacteroides* sp. χρησιμοποιεί το απελευθερωμέν~~α~~ μόρι~~ο~~ο γλυκόζης τα οποία δε θα απορροφηθούν στην κυκλοφορία του αίματος (Renwick and Tarka, 2008) και τα υπόλοιπα προϊόντα του μεταβολισμού αποβάλλονται από το σώμα (Koyama et al, 2003). Ένα μικρό ποσοστό του γλυκουρονιδίου της στεβιόλης

το οποίο παραμένει στο κόλον αποβάλλεται μέσω των κοπράνων και δεν βιοσυσσωρεύεται. Αξίζει να σημειωθεί πως η μετατροπή της στεβιοσίδης σε στεβιόλη ολοκληρώνεται γρηγορότερα από ότι η μετατροπή της ρεμπαουδιοσίδης Α σε στεβιοσίδη (Wingard et al, 1980).

1.1.5 Εκτίμηση της ασφάλειας κατανάλωσης προϊόντων *Stevia*

Πολλαπλοί κανονιστικοί οργανισμοί και οργανισμοί ασφάλειας τροφίμων έχουν εγκρίνει τη χρήση γλυκαντικών προϊόντων που περιέχουν γλυκοζίτες στεβιόλης ως ασφαλή για τα άτομα όλων των ηλικιών (SCF το 1985, JECFA το 1999 και FDA το 2007). Ο αμερικανικός FDA έχει εγκρίνει τη χρήση της πλειονότητας των γλυκοζιτών της στεβιόλης ως ασφαλή συμπληρώματα διατροφής (GRAS Ειδοποίηση 287 για γλυκοζίτες της στεβιόλης με κύρια συστατικά τη στεβιοσίδη και τη ρεμπαουδιοσίδη Α), ορίζοντας την αποδεκτή ημερήσια δόση (ADI) σε 7,9mg/kg του σωματικού βάρους (Xili et al, 1992). Η συγκεκριμένη τιμή ADI ορίζεται ως μία ελάχιστη τιμή, για τον υπολογισμό της οποίας έχει συμπεριληφθεί δείκτης ασφαλείας 1/100. Το νομοσχέδιο DSEA στις ΗΠΑ το 1994 επέτρεψε τη χρήση γλυκοζιτών της στεβιόλης σε συμπληρώματα διατροφής (Williams and Burdock, 2009) και το 2012 ο FDA επέτρεψε τη χρήση τους στα τρόφιμα.

Το 2007, η επιτροπή JECFA με σκοπό τον ορισμό σωστών και αξιόπιστων προδιαγραφών σχετικά με την ασφάλεια της κατανάλωσης των γλυκοζιτών στεβιόλης, όρισε τη χρήση των ισοδύναμων στεβιόλης, ώστε να διευκολυνθεί η σύγκριση των ορίων ασφαλείας. Τα ισοδύναμα στεβιόλης υπολογίζονται με βάση τα σχετικά μοριακά βάρη των γλυκοζιτών. Δηλαδή, η περιεκτικότητα σε στεβιοσίδη πολλαπλασιάζεται με 0.40 και η περιεκτικότητα σε ρεμπαουδιοσίδη Α πολλαπλασιάζεται με 0.33, ώστε οι ποσότητές τους να μετατραπούν σε ισοδύναμα στεβιόλης.

Η επιτροπή JECFA έχει πλέον, μέσω του ενδεδειγμένου επιστημονικού ελέγχου των διαθέσιμων ερευνητικών και πειραματικών στοιχείων, καταλήξει πως η δόση ADI θα οριστεί σε 4 mg/kg σωματικού βάρους, ~~εκφρασμένου-εκφρασμένη~~ ως ~~προς~~ ισοδύναμα στεβιόλης. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε ADI 0-12 mg/kg σωματικού βάρους ημερησίως για την ρεμπαουδιοσίδη Α, η οποία είναι ο κυριότερος γλυκοζίτης ο οποίος συναντάται στα γλυκαντικά προϊόντα *Stevia*. Το 2010, η ευρωπαϊκή επιτροπή EFSA επίσης όρισε τη δόση ADI σε 4 mg/kg σωματικού βάρους

εκφρασμένη ως ~~προς~~ ως ~~προς~~ ισοδύναμα στεβιόλης. Επιπρόσθετα, το 2011 η EFSA επέτρεψε τη χρήση των γλυκοζιτών στεβιόλης ως προσθετικό των τροφών, με σκοπό την καθιέρωση της χρήσης του σε ευρεία κλίμακα στην Ευρώπη (Stoyanova et al, 2011).

1.1.6 Εκτίμηση της τοξικότητας των προϊόντων Stevia

Σχετικά με τυχόν επιπτώσεις των γλυκοζιτών της στεβιόλης στην υγεία, έχουν πραγματοποιηθεί πληθώρα *in vitro* και *in vivo* ελέγχων με σκοπό τη διερεύνηση της χρόνιας τοξικότητας, της ευαισθητοποίησης, της γονιμότητας, της τερατογένεσης, της νεφροτοξικότητας, της ηπατοτοξικότητας, της μεταλλαξιγένεσης, της χρωμοσωμικής βλάβης και της θραύσης των ελίκων DNA. Συγκεκριμένα ως προς τη γενετοξικότητα, 20 επιτροπές ειδικών και διεθνείς οργανισμοί ασφάλειας τροφίμων έχουν καταλήξει πως η στεβιοσίδη, η ρεμπαουδιοσίδη Α και άλλοι ευρέως χρησιμοποιούμενοι γλυκοζίτες της στεβιόλης δεν είναι γενετοξικοί (Gupta et al, 2016) (Urban, Caracostas and Brusick, 2013).

Η ρεμπαουδιοσίδη Α έχει ελεγχθεί ως προς τη γενετοξικότητα μέσω 3 *in vitro* και 2 *in vivo* ελέγχων, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του OECD. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν πως η συγκεκριμένη ένωση δεν είναι γενετοξική σε συγκεντρώσεις ως 5000μg/ml, σύμφωνα με τον έλεγχο για χρωμοσωμικές ανωμαλίες χρησιμοποιώντας V79 κύτταρα κινεζικού χάμστερ, με τον έλεγχο του Ames χρησιμοποιώντας κλώνους *E.coli* και *S.typhimurium* και με τον έλεγχο λεμφώματος σε ποντικούς χρησιμοποιώντας κύτταρα L5178Y+/-, πριν και έπειτα από μεταβολική ενεργοποίηση (Gupta et al, 2016).

Επιπρόσθετα, η ρεμπαουδιοσίδη Α σε δόσεις ως 750mg/kg σωματικού βάρους, δεν εμφάνισε γενετοξικότητα στον έλεγχο μικροπυρήνων σε κύτταρα του μυελού των οστών σε ποντικούς. Παράλληλα, σε μια μη προγραμματισμένη δοκιμή DNA σύνθεσης σε αρουραίους δεν έδειξε γενετοξικότητα σε δόση ως 2000mg/kg σωματικού βάρους (Gupta et al, 2016). Η ρεμπαουδιοσίδη Α δεν προκαλεί ούτε χρωμοσωμικές βλάβες, μεταλλάξεις ή θραύσεις των ελίκων DNA (Brusick, 2008), επομένως συμπεραίνεται από τα στοιχεία που παρέχονται, πως τουλάχιστον στις δόσεις οι οποίες ελέγχθηκαν, δεν είναι γενετοξική (Awney, Massoud and El-Maghrabi, 2011), (Pezzuto et al, 1985), (Nakajima, 2000a), (Nakajima, 2000b) (Sekihashi, Saitoh and Sasaki 2002).

Η στεβιοσίδη έχει επίσης ελεγχθεί ως προς τη γενετοξικότητα με πολλαπλούς *in vivo* και *in vitro* ελέγχους (Suttajit et al, 1993). Οι έλεγχοι αυτοί συμπεριελάμβαναν τον εντοπισμό και την καταμέτρηση χρωμοσωμικών μεταβολών, μεταλλάξεων και απλών θραύσεων του DNA. Τα αποτελέσματα αυτών των ελέγχων δεν υπέδειξαν γενετοξικότητα, με εξαίρεση ένα θετικό αποτέλεσμα με τον έλεγχο του Ames, κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκε ο TA98 *S.typhimurium* κλώνος και συγκέντρωση στεβιοσίδης 50mg ανά πλάκα (Klongpanichpak et al, 1997). Ωστόσο, η συγκεκριμένη συγκέντρωση ξεπερνούσε το ανώτερο επιτρεπτό όριο συγκέντρωσης για τον συγκεκριμένο έλεγχο. Το σύνολο των *in vivo* ελέγχων δεν έδειξαν γενετοξικότητα για τη στεβιοσίδη.

Συγκεκριμένα, η στεβιοσίδη δεν εμφάνισε γενετοξικότητα σε ποντικούς και αρουραίους σε δόση ως 2000mg/kg σωματικού βάρους. Επιπλέον, σε έλεγχο κατά τον οποίο χορηγήθηκαν ακατέργαστοι κρύσταλλοι στεβιοσίδης στα ζώα, δεν παρατηρήθηκε μεταλλαξιγένεση. Με τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν και *in vitro* έλεγχοι του Ames στους κλώνους *S.typhimurium* TA97, TA98, TA102, TA104, TA1535 και TA1537 και στον κλώνο *E.coli* WP2 *uvrA/Pkm101* σε δόση 5mg ανά πλάκα, και για τον TM677 του *S.typhimurium* ~~ούτε~~ σε δόση 10mg ανά πλάκα (Matsui et al, 1996). Επιπρόσθετα, τα ευρήματα των ελέγχων για χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε κύτταρα θηλαστικών σε λέμφωμα Hodgkin και σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα τα οποία επώαστηκαν για 24 ώρες με διαλύματα 1, 5 και 10 mg/ml στεβιοσίδης δεν υπέδειξαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Suttajit et al, 1993).

Οι γλυκοζίτες της στεβιόλης έχουν επίσης μελετηθεί ως προς την καρκινογένεση (Medon et al, 1982). Η επιτροπή JECFA ανακοίνωσε το 1999 πως η στεβιοσίδη δεν αποτελεί πιθανό καρκινογόνο. Οι πιθανές καρκινογόνες επιδράσεις της στεβιοσίδης μελετήθηκαν σε κύτταρα της ουροδόχου κύστης ως προς την εμφάνιση και την προαγωγή καρκινικών βλαβών. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία νεοπλασματική ή προνεοπλασματική βλάβη εξαιτίας της στεβιοσίδης (Hagiwara et al, 1984). Παράλληλα, στα αποτελέσματα μιας συνδυαστικής μελέτης χρόνιας τοξικότητας από του στόματος και καρκινοτοξικότητας διάρκειας 24 μηνών σε ποντικούς Wistar, δεν παρατηρήθηκε καμία νεοπλασματική ή προνεοπλασματική βλάβη σε κανένα είδος ιστού των ποντικών (Williams and Burdock, 2009).

Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα ούτε σε μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας με μέγιστη δόση ως 600mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα (Xili et al, 1992). Χαμηλές συγκεντρώσεις στεβιοσίδης μελετήθηκαν και για τυχόν τοξική επίδραση στον κύκλο απόπτωσης η οποία προκαλείται από έλλειψη ορού. Η μελέτη έγινε με χρήση του PC12 κυτταρικού συστήματος και αναλύσεις DNA ηλεκτροφόρησης και σήματος TUNEL. Η μελέτη έδειξε πως η στεβιοσίδη ενισχύει το συγκεκριμένο είδος απόπτωσης, λόγω αύξησης της έκφρασης Bax και κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, συνεπώς επηρεάζοντας τη ρύθμιση του φυσιολογικού αποπτωτικού κύκλου (Takahashi et al, 2012). Σχετικά με τη ρεμπαουδιοσίδη A, η εφάπαξ χορήγησή της σε δόση ως 2000mg/kg σωματικού βάρους σε αρσενικούς Wistar ποντικούς, δεν οδήγησε σε εμφάνιση τοξικότητας, έπειτα από παρατήρηση για 16 ώρες ~~έπειτα από~~από της χορήγησης (Williams and Burdock, 2009).

Εκτός από τη γενοτοξικότητα και την καρκινογένεση, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τη διερεύνηση τυχόν επιπτώσεων των γλυκοζιτών της στεβιόλης στη γονιμότητα (Planas and Kuc, 1968), αλλά και για εμφάνιση τερατογένεσης. Τα αποτελέσματα μιας μελέτης σε ποντικούς (Yodyingyard and Bunyawong, 1991) και δύο μελετών σε αρουραίους (Mori et al, 1981), (Usami et al, 1995), δείχνουν πως η στεβιοσίδη δεν αποτελεί εμβρυοτοξικό παράγοντα, ούτε παράγοντα τερατογένεσης. Σε μελέτη της τοξικότητας της στεβιοσίδης στην ανάπτυξη, χορηγήθηκε σε ποντικούς στεβιοσίδη σε δόσεις (500, 1000, και 2500) mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, κατά την περίοδο αναπαραγωγής.

Από τους επιμέρους ποντικούς μελετήθηκε η γέννηση τριών νεογνών. Κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν παρατηρήθηκαν επιπτώσεις ούτε στην ικανότητα αναπαραγωγής, τη γονιμότητα, την κύηση, τον αριθμό των εμβρύων και την ανάπτυξη, ούτε και στη γονιμότητα των απογόνων. Σε μελέτη σχετικά με την τερατογένεση, χορηγήθηκε στεβιοσίδη σε ποντικούς Wistar σε δόσεις 0.15, 0.75 και 3% οι οποίες αντιστοιχούν σε 150, 750 και 3000 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα. Πριν και κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, οι αρσενικοί ποντικοί έλαβαν τις παραπάνω δόσεις για 60 ημέρες, ενώ οι θηλυκοί για 14 ημέρες πριν την περίοδο αναπαραγωγής και 7 ημέρες κατά τη διάρκεια κυοφορίας (Mori et al, 1981).

Στα αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στη γονιμότητα και την αναπαραγωγή σχετιζόμενη με τη χορήγηση στεβιοσίδης, ούτε και αναπτυξιακές

δυσμορφίες στα έμβρυα (Takanaka et al, 1991), (Toyoda et al, 1997), (Aze et al, 1991). Παράλληλα, αξιολογήθηκε και η ασφάλεια της ρεμπαουδιοσίδης Α ως προς την αναπαραγωγή, αρχικά με ιστοπαθολογική εξέταση των όρχεων σε αρσενικά ζώα τα οποία είχαν λάβει υψηλές δόσεις μέσω της διατροφής τους, σε σχήματα διάρκειας 28 (δόση 100.000 ppm) και 90 (δόση 50.000 ppm) ημερών. Τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά αποτελέσματα δε φανέρωσαν καμία δυσμενή επίδραση (Curry, Roberts and Brown, 2008).

Την παραπάνω μελέτη για τη διερεύνηση της τοξικότητας στην αναπαραγωγή ακολούθησε μελέτη για τη διερεύνηση της τοξικότητας στην ανάπτυξη. Η ρεμπαουδιοσίδη Α χορηγήθηκε σε αρουραίους κατά τη διάρκεια της κύησης με τη μέθοδο gavage. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν επηρεάζεται ούτε η ενδομήτρια ανάπτυξη και επιβίωση από τη χορήγηση της ρεμπαουδιοσίδης Α, ούτε παρουσιάζονται αναπτυξιακές μεταβολές ή δυσμορφίες των εμβρύων σε καμία από τις χορηγούμενες δόσεις (Yamada et al, 1985). Από τα αποτελέσματα της μελέτης καθορίστηκε και η δόση NOAEL για τη μητρική και την εμβρυϊκή τοξικότητα της ανάπτυξης, και αντιστοιχεί σε δόση ανώτερη των 2000 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, η οποία ήταν και η υψηλότερη δόση η οποία χορηγήθηκε (Sloter, 2008).

1.1.7 Ευνοϊκές επιδράσεις των προϊόντων Stevia στην ανθρώπινη υγεία

Τα εκχυλίσματα του φυτού Stevia έχουν πιθανές φαρμακευτικές δράσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ρύθμιση της υπεργλυκαιμίας (Jeppesen et al, 2002), ινσουλινοτροπική (Jeppesen et al, 2000) και γλυκαγωνιστική δράση (Jeppesen et al, 2003), μείωση της αρτηριακής πίεσης, αντικαρκινική (Mizushima et al, 2005), αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση, μείωση της φλεγμονής, ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Salvador, Sotelo and Paucar, 2014), χημειοπροφύλαξη (Koubaa et al, 2015), διευκόλυνση της πέψης και προστασία της οδοντοστοιχίας και του δέρματος. Τα γλυκαντικά προϊόντα με γλυκοζίτες στεβιόλης χαρακτηρίζονται ως ιδανικά συμπληρώματα της διατροφής για τους ασθενείς με διαβήτη τύπου II, όχι μόνο εξαιτίας της εξαιρετικά χαμηλής θερμιδικής τους αξίας, αλλά και λόγω της γλυκορυθμιστικής τους δράσης.

Συγκεκριμένα, τα εκχυλίσματα του φυτού Stevia αυξάνουν την έκκριση της ινσουλίνης και την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Gregersen et al, 2004), (Chen et al, 2005), πιθανόν λόγω της αναστολής της ηπατικής έκκρισης της PEP καρβοξυκινάσης

και της αύξησης της γλυκονεογένεσης. Επιπλέον, προκαλούν τη διέγερση της ηπατικής σύνθεσης γλυκογόνου. Συγκεκριμένα για τους επιμέρους γλυκοζίτες της στεβιόλης, η δράση της ρεμπαουδιοσίδης Α σε κύτταρα παγκρεατικών νησιδίων ποντικών οδήγησε σε παρατηρήσιμη βελτίωση στην παραγωγή της ινσουλίνης (Abudula et al, 2004), ενώ η στεβιοσίδη προωθεί τη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης όταν η έκκριση προκαλείται από την παρουσία της γλυκόζης έπειτα από ένα γεύμα, χωρίς όμως να επηρεάζει τα επίπεδα της ινσουλίνης στο αίμα σε κατάσταση νηστείας (Yadav et al, 2011).

Τα αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν καταδείξει τη δράση των γλυκοζιτών στην στεβιόλη στη μείωση της αρτηριακής πίεσης. Οι γλυκοζίτες έχουν διουρητική και αγγειοχαλαρωτική δράση (Xiao and Hermansen, 2005), (Jeppesen et al, 2003). Παράλληλα με τη διουρητική δράση, οι γλυκοζίτες προκαλούν νατριουρία, με συνέπεια τη μείωση του όγκου του πλάσματος. Επιπρόσθετα, οι γλυκοζίτες μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση της διάρκειας της καρδιακής συστολής, γεγονός που θα μπορούσε να μειώσει την πιθανότητα για πρόκληση εγκεφαλικού επεισοδίου και να οδηγήσει σε συνολική βελτίωση της υγείας του καρδιαγγειακού συστήματος (Chan et al, 2000). *In vitro* δοκιμές έχουν αναδείξει πως αλκοολικά εκχυλίσματα του φυτού *Stevia* έχουν αντιοξειδωτική δράση, καθώς αναστέλλουν το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων στις τροφές (Shyu et al, 1994), (Masuda et al, 2006). Η αντιοξειδωτική τους δράση ίσως οφείλεται στο μηχανισμό σάρωσης για τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου (JECFA, 2005).

Τα εκχυλίσματα του φυτού *Stevia* αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων τα οποία προκαλούν ουλίτιδα και καταστροφή των δοντιών (Das et al, 1992). Συγκεκριμένα, καλλιέργειες του *Streptococcus mutans* ο οποίος αποτελεί το κυριότερο καριογενές βακτήριο της στοματικής κοιλότητας, οι οποίες επώαστηκαν με θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε γλυκοζίτες της στεβιόλης παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου και μείωση της έκκρισης των όξινων προϊόντων του μεταβολισμού που φθείρουν το σμάλτο, σε σύγκριση με την καλλιέργειά τους σε θρεπτικά υλικά που περιείχαν σακχαρόζη, γλυκόζη ή φρουκτόζη (Grenby, 1997).

Σε μελέτη καρκινογένεσης μοντέλου δύο σταδίων σε ποντικούς, παρατηρήθηκε πως οι γλυκοζίτες της στεβιόλης οδηγούν σε μείωση του σχηματισμού όγκων, έπειτα

από χορήγηση 7,12- διμεθυλοβενζ[α] ανθρακενίου και 12-O- τετραδεκανοϋλοφορβολο-13- οξικού άλατος στο δέρμα (Zhang, Kumar and Kutowy, 2000), (Konoshima and Takasaki, 2002). Τα εκχυλίσματα των φύλλων του φυτού Stevia, τα οποία εκτός από τους γλυκοζίτες στεβιόλης περιέχουν και πολυφαινόλες και άλλες αγλυκόνες, έχουν ανασταλτική επίδραση στον σχηματισμό, την ανάπτυξη και την εγκαθίδρυση των όγκων μέσω αρκετών ακόμα δράσεων (Nakamura, Sakiyama and Takenaga, 1995), (Paul et al, 2012), (Deshmukh and Kedari, 2014), όπως για παράδειγμα με αποκλεισμό του πρώιμου αντιγόνου του ιού Epstein- Barr (Konoshima and Takasaki, 2002), (Yasukawa, Kitataka and Seo, 2002), (Takasaki et al, 2009).

Επιπλέον, οι γλυκοζίτες της στεβιόλης παρουσιάζουν και αντιφλεγμονώδη δράση στο έντερο, κυρίως μέσω της επίδρασής τους στη στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων στο κόλον. Σε συγκεκριμένη μελέτη στα T84 επιθηλιακά κύτταρα στο κόλον σχετικά με την cAmp εξαρτώμενη έκκριση ιόντων χλωρίου, διαπιστώθηκε πως η στεβιόλη και τα ανάλογά της οδηγούν σε μείωση της έκκρισης τους και συνεπώς δρουν αντί-έναντι της διάρροιας (Pariwat et al, 2008). Η αντιφλεγμονώδης δράση των γλυκοζιτών εκδηλώνεται επίσης μέσω της αναστολής που προκαλούν στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών του εντέρου, με αποτέλεσμα την αναστολή της διάρροιας που προκαλείται λόγω υπέρ- κινητικότητας του εντέρου (Shock, 1982).

1.1.8 Νοθεία προϊόντων Stevia

Καθώς, όπως ήδη αναλύθηκε, τα γλυκαντικά προϊόντα Stevia έχουν εκατοντάδες φορές ισχυρότερα γλυκιά γεύση από τα συμβατικά γλυκαντικά όπως η σακχαρόζη, ενώ παράλληλα είναι κατάλληλα για διαβητικούς ασθενείς και για τον έλεγχο του βάρους, επιδεικνύοντας ταυτόχρονα και πληθώρα από πιθανά οφέλη για την υγεία, έχει αυξηθεί πολύ το αγοραστικό ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα προϊόντα. Η τιμή τους ωστόσο, είναι υψηλότερη από εκείνη άλλων γλυκαντικών προϊόντων τα οποία επίσης είναι πολλές φορές πιο γλυκά από τη σακχαρόζη. Συνεπώς, ο κίνδυνος για την εσκεμμένη νοθεία τους με σκοπό το οικονομικό όφελος αποτελεί μια πολύ ρεαλιστική πιθανότητα.

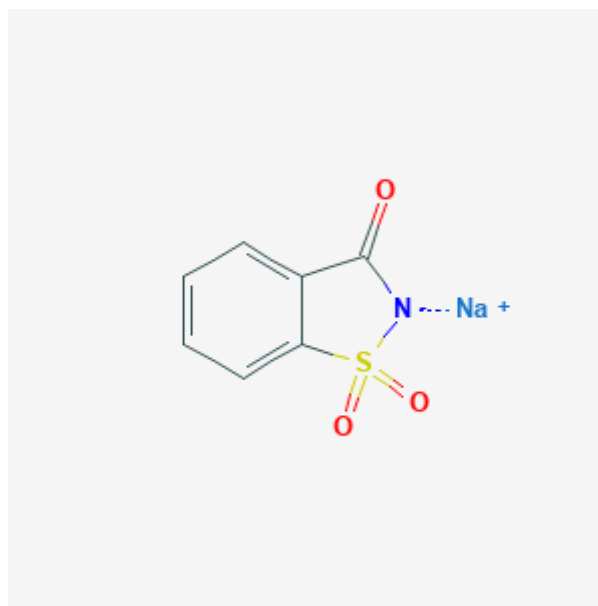
Για την ακρίβεια, ήδη έχουν καταγραφεί κρούσματα νοθείας γλυκαντικών Stevia. Συγκεκριμένα, σε μια μικρή μελέτη εμπορικών προϊόντων Stevia με σκοπό τον εντοπισμό τυχόν νοθείας, από τα 6 δείγματα τα οποία αναλύθηκαν, τα 3 βρέθηκαν

νοθευμένα, ενώ σε ένα ακόμη εντοπίστηκε μεγάλη ποσότητα μαλτοδεξτρίνης, η οποία χρησιμοποιείται στα τρόφιμα απλά ως πληρωτικό του όγκου. Τα συγκεκριμένα εμπορικά προϊόντα είχαν ως χώρα προέλευσης τη Βολιβία. Οι δύο κύριες γλυκαντικές ύλες οι οποίες χρησιμοποιούνται με σκοπό τη νοθεία των γλυκοζιτών της στεβιόλης είναι το άλας της σακχαρίνης και το κυκλαμικό άλας (Jentzsch et al, 2016). Ωστόσο, η χρήση του κυκλαμικού αλάτος έχει απαγορευθεί στην Ινδία, την Αμερική, τον Καναδά και την Ευρωπαϊκή ένωση, λόγω της μετατροπής του σε κυκλοεξυλαμίνη στο γαστρεντερικό σωλήνα, η οποία είναι πιθανό καρκινογόνο (Sastry et al, 1995).

Ένα ακόμη κρούσμα νοθείας το οποίο έλαβε μεγάλη διάσταση αφορά την εταιρεία Pure Stevia του ομίλου VJS Cosmo Enterprise της Μαλαισίας, το προϊόν της οποίας αντίθετα με όσα ανέφερε στην ετικέτα του, δεν περιείχε εκχύλισμα του φυτού, αλλά συνδυασμό δυνητικά επικίνδυνων χημικών ενώσεων. Το τελευταίο συμβάν ώθησε το τμήμα Ασφάλειας και Ποιότητας Τροφίμων του αντίστοιχου Υπουργείου της Μαλαισίας να εντείνει τους ελέγχους στα προϊόντα γλυκαντικών Stevia, από τους οποίους ελέγχους διαπιστώθηκε πως 10 ακόμη εγχώρια προϊόντα Stevia ήταν νοθευμένα (Khoo, 2017), (Lenggong, 2017). Τα σοβαρά αυτά κρούσματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για την ανάπτυξη και επικύρωση γρήγορων, απλών, οικονομικών και ευαίσθητων μεθοδολογιών για εντοπισμό δυνητικά επικίνδυνων προϊόντων Stevia.

1.2 Μέθοδοι ανάλυσης για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων Stevia

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σχετική με το σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα αναπτυχθεί μη αποσκοπεί στην ανάπτυξη μη χρωματογραφικής μεθοδολογίας ανάλυσης σχετικά για με τη διερεύνηση της νοθείας προϊόντων Stevia. Η μεθοδολογία θα περιλαμβάνει τόσο την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των γλυκοζιτών της στεβιόλης όσο και του αλάτος της σακχαρίνης και του κυκλαμικού αλάτος, το οποίο κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται εξαιτίας για τη νοθεία προϊόντων Stevia. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη της μεθοδολογίας για την ποσοτικοποίηση των γλυκοζιτών στεβιόλης θα αφορά τη ρεμπαουδιοσίδη Α, καθώς είναι είτε ο μοναδικός γλυκοζίτης ο οποίος χρησιμοποιείται στα εμπορικά προϊόντα Stevia, ή ο γλυκοζίτης εκείνος η συγκέντρωση του οποίου αποτελεί την τεράστια σημαντική πλειονότητα του συνολικού περιεχόμενου του προϊόντος σε γλυκοζίτες στεβιόλης.



Εικόνα 5: Δομή του άλατος της σακχαρίνης (Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2019)

Το γεγονός αυτό οφείλεται στο βελτιωμένο γευστικό προφίλ της ρεμπαουδιοσίδης Α σε σχέση με τη στεβιοσίδα, η οποία επίσης αποτελεί κύριο γλυκοζίτη της στεβιόλης. Παράλληλα με τις μη χρωματογραφικές μεθόδους, τα δείγματα αναλύθηκαν με πρωτόκολλο ανάλυσης HPLC/UV, καθώς το επικυρωμένο πρωτόκολλο που προτείνεται από τον οργανισμό JECFA (JECFA, 2016) και το οποίο χρησιμοποιήθηκε, είναι η πρότυπη μέθοδος η οποία επικύρωσε τα αποτελέσματα των φωτομετρικών αναλύσεων. Η HPLC ανάλυση δίνει τη δυνατότητα μέσω σύγκρισης των χρόνων κατακράτησης και των φασμάτων απορρόφησης να γίνει και ένα είδος ταυτοποίησης των ενώσεων, μετά από διαχωρισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α και του άλατος της σακχαρίνης. Επιπλέον, θα δοθεί η δυνατότητα να διαχωριστούν οι επιμέρους γλυκοζίτες της στεβιόλης και το άλας της σακχαρίνης με το κυκλαμικό άλας, ώστε το παρατηρούμενο σήμα τους (στη δεδομένη περίπτωση το εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής) να ληφθεί υπόψη ξεχωριστά.

Ωστόσο, τα μειονεκτήματα μιας HPLC ανάλυσης είναι πως χρειάζεται εκτεταμένη προκατεργασία των δειγμάτων έως ότου αυτά είναι έτοιμα να εγχυθούν στη χρωματογραφική στήλη, για παράδειγμα διαλυτοποίηση σε διαλύτες ή αναλογία διαλυτών συμβατή τόσο με τη φύση της προς ανάλυση ουσίας όσο και της κινητής φάσης, εκχυλίσεις για καθαρισμό του δείγματος, φιλτράρισμα με κατάλληλους ηθμούς κ.α., ενώ ταυτόχρονα απαιτείται και αυξημένος χρόνος για την ολοκλήρωση της ανάλυσης, αυξημένο κόστος για την απόκτηση και τη συντήρηση του οργάνου

και για τα αναλώσιμα των χρωματογραφικών αναλύσεων, ανάγκη για εξειδικευμένους χειριστές του οργάνου, αλλά και εκτεταμένες δοκιμές βελτιστοποίησης των χρωματογραφικών συνθηκών, ώστε να πραγματοποιηθεί επιτυχής διαχωρισμός μεταξύ των κορυφών από αναλύτες οι οποίοι είναι δομικά όμοιοι και μοιράζονται κοινές φυσικοχημικές ιδιότητες.

1.2.1 Μεθοδολογία προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α

Οι μη χρωματογραφικές μέθοδοι οι οποίες θα ελεγχθούν σχετικά με την ποσοτικοποίηση της ρεμπαουδιοσίδης Α, θα βασίζονται στην απελευθέρωση των μονάδων της γλυκόζης από το μόριο της ρεμπαουδιοσίδης Α μέσω υδρόλυσης υδρόλυσής και του μορίου της και [gt1] τον μετέπειτα ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης, με μεθόδους η αρχή των οποίων θα βασίζεται είτε στις ιδιότητες της γλυκόζης ως ανάγων σάκχαρο, ή σε κάποια (ενζυματική-ενζυματικά καταλυόμενη ή μη) αντίδραση-ή αντίδραση η οποία παράγει κάποιο έγχρωμο σύνθετο προϊόν. Εξαιτίας της σημαντικής διαγνωστικής αξίας του ποσοτικού προσδιορισμού της γλυκόζης σε βιολογικά δείγματα, η βιβλιογραφία σχετικά με την ποσοτικοποίηση της γλυκόζης είναι εκτενής, και υπάρχουν διαθέσιμα μέχρι και εμπορικά kits για τον ποσοτικό προσδιορισμό της (Papadopoulos, 2019).

Η υδρόλυση του μορίου της ρεμπαουδιοσίδης Α με επακόλουθη την απελευθέρωση της γλυκόζης θα δοκιμαστεί να επιτευχθεί με επώαση των δειγμάτων ρεμπαουδιοσίδης Α σε πολύ όξινες τιμές pH, σε συνδυασμό παραμονής σε υψηλή θερμοκρασία και πολύ χαμηλή τιμή pH, ενώ θα δοκιμαστεί παράλληλα ενζυματική υδρόλυση του μορίου με παγκρεατίνη και χημική αποικοδόμηση του επώασή-του-σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 10%. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιείται έλεγχος για την παρουσία γλυκόζης στα δείγματα (γεγονός που θα σηματοδοτεί την επιτυχημένη υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α) με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP.

Η σταθερότητα των μορίων των γλυκοζιτών της στεβιόλης έχει μελετηθεί σε διάφορα συστήματα ενδιαφέροντος, όπως σε όξινα διαλύματα και όξινα διαλύματα τα οποία υπόκεινται σε έντονη θέρμανση (θερμοκρασία ως 100 °C), καθώς τα γλυκαντικά προϊόντα Stevia χρησιμοποιούνται πλέον σε χυμούς φρούτων και αναψυκτικά τα οποία αποτελούν όξινα διαλύματα (Catharino and Santos, 2012). Επιπλέον, τα γλυκαντικά αυτά προϊόντα προστίθενται σε ροφήματα καφέ ή/ και

τσαγιού τα οποία συχνά σερβίρονται σε βραστό νερό και επίσης έχουν ελαφρώς όξινο pH (Prakash, Chaturvedula and Markosyan, 2014), (Chaturvedula et al, 2013), (Chaturvedula and Meneni, 2015), (Chaturvedula and Prakash, 2011).

Η σταθερότητα σε σημαντικό βαθμό των γλυκοζιτών της στεβιόλης στα τρόφιμα είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να θεωρηθεί ασφαλής η κατανάλωσή τους, επειδή θεωρείται πως το μόριο της στεβιόλης το οποίο είναι λιπόφιλο, θα μπορούσε να απορροφηθεί στη συστηματική κυκλοφορία και δείχνει να έχει μεταλλαξιγόνο δράση και επιπτώσεις στη γονιμότητα (Pezzuto et al, 1985), (Melis, 1999). Σύμφωνα με την πλειονότητα των βιβλιογραφικών αναφορών, η υδρόλυση μπορεί να επιτευχθεί σε διαλύματα ισχυρών οξέων περίπου 10% και με έντονη θέρμανση σε αναρροή (reflux) για αρκετές ώρες (Chaturvedula, 2015). Ωστόσο, οι Catharino και Santos αναφέρουν υδρόλυση της στεβιοσίδης σε τιμή pH περίπου 2.5 χωρίς θέρμανση (Catharino and Santos, 2012).

Η διερεύνηση της σταθερότητας των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι επίσης αναγκαία για τη χρήση τους σε φαρμακευτικά προϊόντα, είτε ως διορθωτικά της γεύσης ή ως ενεργά φαρμακευτικά συστατικά. Για αυτό το λόγο, έχει επίσης μελετηθεί η οξειδωτική αποικοδόμησή τους σε διαλύματα υπεροξειδίου του υδρογόνου 10%. Τα αποτελέσματα δείχνουν πλήρη αποικοδόμηση έπειτα από 72 ώρες (Matono et al, 2018). Επιπλέον, η μελέτη της υδρόλυσης των γλυκοζιτών στεβιόλης είναι χρήσιμη για την απόκτηση της στεβιόλης σε μεγάλο ποσοστό για τη χρήση της στην παραγωγή νέων βιοενεργών ενώσεων (Milagre, Martins and Takahashi, 2009). Προς αυτό το σκοπό, μελετήθηκε η ενζυματική υδρόλυση των γλυκοζιτών, και επιτεύχθηκε ποσοστό υδρόλυσης ως 93.9% με χρήση παγκρεατίνης και τολουολίου (Milagre, Martins and Takahashi, 2009).

Η επακόλουθη ποσοτικοποίηση της γλυκόζης θα δοκιμαστεί με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP, με την αντίδραση με 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος και επακόλουθο φωτομετρικό προσδιορισμό, και με την αντίδραση των δειγμάτων με διάλυμα αλάτων του Δημητρίου και επακόλουθη θέρμανση. Η ~~παραπάνω-τελευταία~~ αντίδραση επίσης οδηγεί σε σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος το οποίο θα μπορούσε να προσδιοριστεί φωτομετρικά. Οι δύο τελευταίες μέθοδοι βασίζονται στην ιδιότητα της γλυκόζης ως ανάγον σάκχαρο [gt2].

Η ενζυματική μέθοδος GOD/PAP βασίζεται στην οξείδωση της γλυκόζης παρουσία του ενζύμου γλυκόζο οξειδάση (GOD) και παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στη συνέχεια, το υπεροξείδιο αντιδρά με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη και η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα (Papadopoulos, 2019).

Η μέθοδος του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος δίνει θετικό αποτέλεσμα παρουσία ελεύθερης καρβονυλομάδας η οποία εντοπίζεται στα ανάγοντα σάκχαρα. Η αντίδραση περιλαμβάνει την οξείδωση της αλδεϋδομάδας της γλυκόζης και την ταυτόχρονη αναγωγή του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος σε 3-άμινο,5-νιτροσαλικυλικό οξύ σε αλκαλικές συνθήκες. Ο σχηματισμός του 3-άμινο,5-νιτροσαλικυλικού οξέος αλλάζει το χρώμα του διαλύματος από πορτοκαλί σε βαθύ κόκκινο ως καφέ χρώμα, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της απορρόφησης του στα 540 nm.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης των γλυκοζιτών της στεβιόλης με αντίδρασή τους με διάλυμα αλάτων του Δημητρίου σε θερμοκρασία κοντά στους 100 °C προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος, αποτελεί τη βάση της μεθόδου χρώσης TLC, η οποία ονομάζεται Hanessian's blue. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται για τη χρώση αναγόντων σακχάρων, η χρωματογραφική πλάκα βυθίζεται σε υδατικό διάλυμα 1% w/v εναμμώνιου θεικού δημητρίου, 2,5% w/v τετραϋδρικού μολυβδαινικού αμμωνίου και 10% v/v θεικού οξέος και έπειτα από θέρμανση στους 100 °C για περίπου 10 λεπτά, τα σημεία των αναγόντων σακχάρων χρωματίζονται σκούρα μπλε. Το διάλυμα της χρωστικής Hanessian's blue θα προστεθεί στα διαλύματα των γλυκοζιτών, τα οποία θα θερμανθούν στους 100 °C και αν επιτευχθεί ανάπτυξη μπλε χρώματος θα διερευνηθεί η γραμμικότητα της απορρόφησης των διαλυμάτων ως προς τη συγκέντρωση των γλυκοζιτών.

Ένα ακόμη εμπόδιο το οποίο θα πρέπει να ξεπεραστεί, είναι η τυχόν ύπαρξη γλυκόζης στα δείγματα Stevia πριν από την υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α. Σε περίπτωση που η γλυκόζη αποτελεί συστατικό των προς ανάλυση δειγμάτων, θα πρέπει να αποδειχθεί ~~είτε~~ πως η αρχική της ποσότητα στο δείγμα παραμένει σταθερή και έπειτα από τη θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία και τη μείωση του pH, ή την ενζυματική υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α, ώστε η διαφορά στην τιμή της

γλυκόζης πριν και μετά την υδρόλυση να αντιστοιχεί μόνο στην ποσότητα αυτής που ελευθερώνεται από της ρεμπαουδιοσίδης Α₇. Εναλλακτικά, θα πρέπει είτε η ποσότητα της γλυκόζης η οποία προϋπάρχει στο δείγμα να απομακρυνθεί πριν τη διαδικασία της υδρόλυσης.

Η απομάκρυνση αυτή θα μπορούσε να επιτευχθεί ενζυματικά, με χρήση του συστήματος των ενζύμων οξειδάσης/υπεροξειδάσης/εξοκινάσης της γλυκόζης/δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Παρουσία του ενζύμου της εξοκινάσης η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία με τη βοήθεια του ενζύμου 6-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνεται με ταυτόχρονη αναγωγή του συνενζύμου NAD⁺ σε NADH. Το γλυκονικό-6-P και το NADH τα οποία παράγονται δεν απορροφούν στην περιοχή του ορατού φωτός, συνεπώς δε αναμένεται να προκαλεί παρεμβολή σε κάποια από τις προτεινόμενες μεθόδους ποσοτικοποίησης των γλυκοζιτών της στεβιόλης (Papadopoulos, 2019). τα οποία δέχονται ως υπόστρωμα τη γλυκόζη.

1.2.2 Μεθοδολογία προσδιορισμού σακχαρίνης

Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας προσδιορισμού νοθευτικών αφορά μόνο τη σακχαρίνη, καθώς αποτελεί μία από τις κύριες ουσίες νοθείας στα μέχρι τώρα καταγεγραμμένα κρούσματα, ενώ η χρήση της δεν είναι απαγορευμένη στα τρόφιμα. Για αυτό το λόγο αναμένεται να αποτελέσει το συχνότερο νοθευτικό γλυκαντικό. Σχετικά με τον προσδιορισμό της, θα αναπτυχθεί/χρησιμοποιηθεί πρωτόκολλο της βιβλιογραφίας (Sastry et al, 1995) κατά το οποίο σχηματίζεται σύμπλοκο-ζεύγος ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της σακχαρίνης και του κυκλαμικού άλατος και χρωστικών θιαζίνης ή οξαζίνης. Το παραπάνω έγχρωμο σύμπλοκο μπορεί να εκχυλιστεί σε χλωροφόρμιο και έπειτα να προσδιοριστεί φωτομετρικά. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το άλας του κυκλαμικού νατρίου συμπροσδιορίζεται, αδιάκριτα με τη σακχαρίνη, με την ίδια μεθοδολογία.

Συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιηθεί η χρωστική μπλε του μεθυλενίου και τα δείγματα Stevia θα αραιωθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να βρίσκονται σε σταθερή τιμή pH περίπου 3,8. [gt3]Στη συγκεκριμένη τιμή pH και χάρη στην τιμή pK_A της χρωστικής και της σακχαρίνης, η χρωστική και η ουσία νοθείας αποκτούν κατάλληλο (αντίθετο) φορτίο, ώστε να είναι βέλτιστη η δημιουργία ζεύγους ιόντων. Το έγχρωμο σύμπλοκο-ζεύγος ιόντων που δημιουργείται απορροφά στα 652 nm. Το

συγκεκριμένο πρωτόκολλο δεν επιτυγχάνει διαχωρισμό μεταξύ των διαφορετικών νοθευτικών γλυκαντικών, ώστε να ποσοτικοποιηθούν ξεχωριστά. Για το λόγο αυτό, τα αποτελέσματα της ανάλυσης τα οποία υπολογίζονται από την καμπύλης αναφοράς για τη συγκέντρωση της σακχαρίνης ως προς το παρατηρούμενο σήμα, θα εκφραστούν σε ισοδύναμ~~α~~ε σακχαρίνης.

1.2.3 HPLC Μεθοδολογία προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α και νοθευτικών γλυκαντικών

Για την HPLC/UV ανάλυση των γλυκοζιτών στεβιόλης και του άλατος της σακχαρίνης προτείνεται το μήκος κύματος 210 nm, καθώς σε αυτό παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης η ρεμπαουδιοσίδη Α και σημαντική απορρόφηση η σακχαρίνη. [gt4] Προτείνεται να δοκιμαστεί χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με στήλη διαστάσεων 250 x 4.6 mm, ώστε να επιτρέπεται υψηλότερη ροή κινητής φάσης και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των επιμέρους αναλυτών. Ως στατική φάση προτείνεται να δοκιμαστεί πορώδης σίλικα με προσδεδεμένες ομάδες οκταδέκυλο σιλανίου. Επιπλέον, προτείνεται η στήλη να διατηρηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) κατά τον διαχωρισμό στο θερμοστατούμενο θάλαμο του οργάνου.

Ως κινητή φάση θα δοκιμαστούν τα εξής συστήματα διαλυτών: 1. ακετονιτρίλιο/ νερό σε αναλογία 80/20 v/v και ισοκρατική έκλουση, 2. ακετονιτρίλιο/ νερό σε αναλογία 90/10 v/v και υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0,1% v/v, [gt5] τοποθετημένα σε δύο ξεχωριστά κανάλια του χρωματογράφου και με ισοκρατική έκλουση σε αναλογία περίπου 90% από το κανάλι του οργανικού διαλύματος και 10% από το κανάλι του υδατικού διαλύματος. Οι προτεινόμενες συνθήκες βασίζονται στο προτεινόμενο πρωτόκολλο HPLC ανάλυσης της επιτροπής JECFA σχετικά με τον ποσοτικό προσδιορισμό των γλυκοζιτών της στεβιόλης (JECFA, 2017).

2. Πειραματικό μέρος

Η ανίχνευση και ο (ημι)ποσοτικός προσδιορισμός της ρεμπαουδιοσίδης A, βασίστηκε στον προσδιορισμό της γλυκόζης που απελευθερώνεται από το μόριό της, μετά από την υδρόλυσή της. Για το σκοπό αυτό, αρχικά διερευνήθηκε η ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την υδρόλυση των γλυκοζιτών της στεβιόλης, και στη συνέχεια για τον προσδιορισμό τους μέσω της απελευθερωμένης γλυκόζης.

2.1 Υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης A

Για την επίτευξη της υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης A και της επακόλουθης απελευθέρωσης της γλυκόζης, με σκοπό τον γρήγορο, απλό και ανέξοδο ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης A, δοκιμάστηκε όξινη υδρόλυση σε τιμές pH 1 ως 3, υδρόλυση σε συνθήκες όξινου pH και υψηλής θερμοκρασίας ταυτόχρονα, ενζυματική υδρόλυση με τη χρήση παγκρεατίνης και απελευθέρωση γλυκόζης με χημική αποικοδόμηση της ρεμπαουδιοσίδης A με υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 10%.

2.1.1 Όξινη υδρόλυση

2.1.1.1 Υλικά

- Ρεμπαουδιοσίδα A σε καθαρότητα 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- Υδροχλωρικό οξύ 37% της εταιρείας Fischer, USA
- Υδροξείδιο του νατρίου καθαρότητας reagent grade της εταιρείας Lachner, Check Republic
- Κιτ GOD/PAP για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης της εταιρείας Biosis, Αθήνα
- οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας analytical grade της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- μεθανόλη της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC
- υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- πλάκες TLC με επίστρωση silica και φθορίζοντα δείκτη UV254 της εταιρείας Merck, USA
- θειικό οξύ καθαρότητας 97-101% της εταιρείας Fischer, USA

- μολυβδαινικό αμμώνιο τετραϋδρικό της εταιρίας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- εναμμώνιο θειικό δημήτριο της εταιρίας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- αναλυτικός ζυγός της εταιρίας KERN 4 δεκαδικών ψηφίων
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl
- φωτόμετρο Ultraspec pro 2100 ορατού/ υπεριώδους φωτός της εταιρείας Amersham Biosciences

2.1.1.2 Μέθοδος

Για την επίτευξη της υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α και την απελευθέρωση γλυκόζης, δοκιμάστηκε η όξινη υδρόλυσή της σε τιμές pH 1, 2 και 3 αντίστοιχα, με σκοπό να αναπαραχθούν οι συνθήκες υπό τις οποίες παρατηρήθηκε όξινη υδρόλυση από τους Catharino και Santos (Catharino and Santos, 2012). Παρασκευάστηκαν δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α συγκέντρωσης 2mg/ml σε νερό και σε αυτά προστέθηκαν διαλύματα υδροχλωρικού οξέος σε αναλογία 10μl όξινου διαλύματος ανά 1ml δείγματος ρεμπαουδιοσίδης Α δίνοντας τελικές τιμές pH 1, 2 και 3.

Αφότου τα δείγματα της ρεμπαουδιοσίδης Α παρέμειναν στις παραπάνω τιμές pH για 24 ώρες, ακολούθησε έλεγχος της υδρόλυσής τους. Αρχικά το όξινο pH τους εξουδετερώθηκε με χρήση υδροξειδίου του νατρίου, και έπειτα τα δείγματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη γλυκόζης με TLC και προσδιορίστηκε ποσοτικά η πιθανή ύπαρξη της γλυκόζης στα δείγματα με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP. Για την TLC ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το βέλτιστο πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 2.2.3, ενώ για την ανάλυση με τη μέθοδο GOD/PAP ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή: 1 ml διαλύματος εργασίας (ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει τα ένζυμα της γλυκόζης οξειδάσης και υπεροξειδάσης) ανά 10μl δείγματος ρεμπαουδιοσίδης Α.

2.1.1.3 Αποτελέσματα

Τιμή pH	Δείγμα Ρεμπαουδιοσίδης Α	Αποτέλεσμα
1	Ρεμπαουδιοσίδη Α 2mg/ml σε νερό	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP

2	Ρεμπαουδιοσίδη Α 2mg/ml σε νερό	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
3	Ρεμπαουδιοσίδη Α 2mg/ml σε νερό	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP

Πίνακας 2: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα της διερεύνησης της όξινης υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α

Έπειτα από 24 ώρες επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, δεν ανιχνεύθηκε καμία ποσότητα γλυκόζης στα διαλύματα της ρεμπαουδιοσίδης Α, σε καμία από τις τρεις τιμές pH. Πιθανολογείται πως αν και η ρεμπαουδιοσίδη Α παραμένει σταθερή στα διαλύματα για 24 ώρες, η επώαση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα οδηγούσε στην υδρόλυση της. Ωστόσο, ένα πρωτόκολλο ποσοτικού προσδιορισμού το οποίο δεν απαιτεί επώαση πολλών ημερών θα ήταν περισσότερο χρήσιμο και πρακτικό, συνεπώς δε διερευνήθηκε περαιτέρω η όξινη υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α.

2.1.2 Ενζυματική υδρόλυση

2.1.2.1 Υλικά

- ρεμπαουδιοσίδη Α καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- παγκρεατίνη της εταιρείας Mylan, σε καψάκια στο καθένα από τα οποία περιέχονται 10000 μονάδες λιπάσης, 8000 μονάδες αμυλάσης και 600 μονάδες πρωτεάσης
- τολουόλιο της εταιρείας Fischer, USA και καθαρότητας analytical grade
- οξικό οξύ της εταιρείας CARLO ERBA, France και καθαρότητας analytical grade
- οξικό νάτριο της εταιρείας Lachner, Check Republic και καθαρότητας
- κιτ GOD/PAP για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης της εταιρείας Biosis, Αθήνα
- οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας analytical grade της εταιρείας Fischer, USA

- μεθανόλη της εταιρίας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρίας Chem lab NV, Belgium
- πλάκες TLC με επίστρωση silica και φθορίζοντα δείκτη UV254 της εταιρείας Merck, USA
- θειικό οξύ καθαρότητας 97-101% της εταιρείας Fischer, USA
- μολυβδαινικό αμμώνιο τετραϋδρικό της εταιρείας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- εναμμόνιο θειικό δημήτριο της εταιρείας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- αναλυτικός ζυγός της εταιρείας KERN 4 δεκαδικών ψηφίων
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl
- pH μέτρο της εταιρείας Consort
- φωτόμετρο Ultraspec 2100 pro ορατού/ υπεριώδους φωτός της εταιρείας Amersham Biosciences

2.1.2.2 Μέθοδος

Σύμφωνα με τη δουλειά των Milagre, Martins και Takahashi (Milagre, Martins and Takahashi, 2009), η ρεμπαουδιοσίδη Α μπορεί να υδρολυθεί από την παγκρεατίνη παρουσία τολουολίου σε τιμή pH 4, σε ποσοστό ως 93.9% σε 7 μέρες. Η παγκρεατίνη δε δέχεται υπό φυσιολογικές συνθήκες ως υπόστρωμα της τη ρεμπαουδιοσίδη Α, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σχετικά με το μεταβολισμό της από τον άνθρωπο (Hutapea et al, 1997), (Koyama et al, 2003). Ωστόσο, στην τιμή pH 4 η οποία δεν είναι η βέλτιστη τιμή για την παγκρεατίνη και παρουσία του τολουολίου, θεωρείται πως η αμυλάση της παγκρεατίνης υφίσταται κατάλληλη αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή της, η οποία της επιτρέπει να δεχθεί τη ρεμπαουδιοσίδη Α ως υπόστρωμα, οδηγώντας στην απελευθέρωση γλυκόζης (Milagre, Martins and Takahashi, 2009).

Η ανάπτυξη πρωτοκόλλου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α η αρχή του οποίου βασίζεται στην ενζυματική υδρόλυση, προσφέρει το σημαντικό πλεονέκτημα της πολύ αυξημένης ειδικότητας. Η επίτευξη πολύ αυξημένης ειδικότητας είναι ο λόγος που παραβλέπεται το γεγονός πως η μέθοδος απαιτεί μεγάλο χρόνο επώασης. Ωστόσο, αντί για τις 7 ημέρες που αναφέρονται από τους

Milagre, Martins και Takahashi, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες στις 2 και 24 ώρες επώασης, με σκοπό να υπολογιστεί το ποσοστό της τυχόν υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης A και το ποσοστό αυτό να συνυπολογιστεί στον τελικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης A στα δείγματα.

Επιπλέον, πέραν της προσθήκης τολουολίου και της μεταβολής του pH, διερευνήθηκε και η μεταβολή της θερμοκρασίας επώασης και η προσθήκη ιόντων χλωρίου και ασβεστίου στο ρυθμιστικό διάλυμα, που είναι συμπαράγοντες της αμυλάσης, για την επίτευξη της υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης A από την παγκρεατίνη. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα είναι ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, το οποίο παρασκευάζεται με προσθήκη 5,8 g οξικού νατρίου σε 800 ml νερού, ρύθμιση του pH στο 4.0 με οξικό οξύ και συμπλήρωση του όγκου με νερό ως το 1000 ml. Η σκόνη της παγκρεατίνης πρέπει να προστίθεται στο δείγμα τουλάχιστον 30 λεπτά πριν την προσθήκη της ρεμπαουδιοσίδης A, ώστε να έχει αναδιπλωθεί πλήρως η δομή των ενζύμων.

Μετά την επώαση, τα δείγματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη γλυκόζης με TLC και προσδιορίστηκε ποσοτικά η πιθανή ύπαρξη της γλυκόζης στα δείγματα με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP. Ως control σχετικά με τη δράση του ενζύμου, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης 5 mg/ml στο ρυθμιστικό διάλυμα με pH 4, με προσθήκη 6.8mg παγκρεατίνης και 130μl τολουολίου, για να διαπιστωθεί αν η τυχόν γλυκόζη που θα παραχθεί από την υδρόλυση, καταναλώνεται στη συνέχεια από την παγκρεατίνη. Πριν τις δοκιμές για την ενζυματική υδρόλυση, δοκιμάστηκε αν η παρουσία τολουολίου επηρεάζει τη δράση των ενζύμων της μεθόδου GOD/PAP με την ανάλυση διαλυμάτων γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης και δεν διαπιστώθηκε καμία παρεμπόδιση.

2.1.2.3 Αποτελέσματα

Ρεμπαουδιοσίδη A (mg)	Ρυθμιστικό διάλυμα pH=4 (ml)	Τολουόλιο (μl)	Παγκρεατίνη (mg)	Θερμοκρασία (°C)	Αποτέλεσμα
40	5	130	6.8	37	Αρνητικό για παρουσία

					γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
40	5	130	16	37	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5, 20 mM NaCl	130	160	25	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5, 20 mM NaCl	260	160	25	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5	130	160	25	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5	260	160	25	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP

120	5, 20 mM NaCl	130	160	42	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5, 20 mM NaCl	260	160	42	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5	130	160	42	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5	260	160	42	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5, 20 mM CaCl ₂	130	160	37	Αρνητικό για παρουσία γλυκόζης με TLC και GOD/PAP
120	5, 20 mM CaCl ₂	260	160	37	Αρνητικό για παρουσία

Πίνακας 3: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα για την ενζυματική υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α

Έπειτα από δειγματοληψία στις 2 και στις 24 ώρες επώασης, δεν ανιχνεύθηκε καμία ποσότητα γλυκόζης στα διαλύματα της ρεμπαουδιοσίδης Α, σε καμία από τις συνθήκες οι οποίες δοκιμάστηκαν. Η επώαση των δειγμάτων συνεχίστηκε ως τις 7 ημέρες όπως και στο πειραματικό πρωτόκολλο των Milagre, Martins και Takahashi, ωστόσο και πάλι δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα γλυκόζης. Παράλληλα, στο δείγμα control της γλυκόζης, η συγκέντρωσή της η οποία ελέγχθηκε με τη μέθοδο GOD/PAP, η γλυκόζη παρέμεινε σταθερή ως τις 48 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει πως δεν καταναλώνεται από την παγκρεατίνη.

2.1.3 Χημική αποικοδόμηση

2.1.3.1 Υλικά

- ρεμπαουδιοσίδη Α καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% της εταιρείας SIGMA- ALDRICH
- κιτ για το φωτομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης με τη μέθοδο εξοκινάσης της εταιρείας Medicon, Αθήνα
- οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας analytical grade της εταιρείας Fischer, USA
- μεθανόλη της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- πλάκες TLC με επίστρωση silica και φθορίζοντα δείκτη UV254 της εταιρείας Merck
- θειικό οξύ καθαρότητας 97-101% της εταιρείας Fischer, USA

- μολυβδαινικό αμμώνιο τετραϋδρικό της εταιρίας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- εναμμώνιο θειικό δημήτριο της εταιρίας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- αναλυτικός ζυγός της εταιρίας KERN 4 δεκαδικών ψηφίων
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl

2.1.3.2 Μέθοδος

Σύμφωνα με μελέτη (Matono et al, 2018) σχετικά με την οξειδωτική αποικοδόμηση της ρεμπαουδιοσίδης A, ο γλυκοζίτης αποικοδομείται πλήρως σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 10% έπειτα από 72 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης, το διάλυμα θα πρέπει να προφυλάσσεται από το φως. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης που πιθανώς θα προκύψει από την οξειδωτική υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης A, δεν κρίνεται κατάλληλη η μέθοδος GOD/ PAP, καθώς σε αυτή τη μέθοδο το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της οξείδωσης της γλυκόζης από τη γλυκόζο οξειδάση και σε περίπτωση που δεν καταναλωθεί όλη η ποσότητά του κατά την επώαση των 72 ωρών, αναμένεται να προκαλέσει ψευδή αύξηση της απορρόφησης.

Εναλλακτικά, αντί για τη μέθοδο HPLC, η γλυκόζη μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη φωτομετρική μέθοδο της εξοκινάσης. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιγράφεται στην ενότητα 1.2.1 σχετικά με την απομάκρυνση τυχόν ποσότητας γλυκόζης η οποία προϋπάρχει σε δείγματα ρεμπαουδιοσίδης A, πριν την υδρόλυσή της (Papadopoulos, 2019). Πριν τις δοκιμές για την οξειδωτική υδρόλυση, δοκιμάστηκε αν η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου επηρεάζει τη δράση των ενζύμων της μεθόδου εξοκινάσης με την ανάλυση διαλυμάτων γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης και δεν διαπιστώθηκε καμία παρεμπόδιση.

2.1.3.3 Αποτελέσματα

Δείγματα	Επώαση	Αποτελέσματα TLC	Αποτελέσματα εξοκινάσης
200ppm και 600ppm ρεμπαουδιοσίδης A	8 ώρες	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη, μόνο ένα σημείο που	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη

σε υδατικό διάλυμα 10% υπεροξειδίου		αντιστοιχεί στο υπεροξείδιο	
200 ppm και 600ppm ρεμπαουδιοσίδης Α σε υδατικό διάλυμα 10% υπεροξειδίου	72 ώρες	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη, μόνο ένα σημείο που αντιστοιχεί στο υπεροξείδιο	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη
200 ppm και 600ppm ρεμπαουδιοσίδης Α σε υδατικό διάλυμα 10% υπεροξειδίου	7 ημέρες	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη, μόνο ένα σημείο που αντιστοιχεί στο υπεροξείδιο	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη
200 ppm και 600ppm ρεμπαουδιοσίδης Α σε διάλυμα ακετονιτριλίου/ νερού, 8/2, v/v και 10% υπεροξειδίου	8 ώρες	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη, μόνο ένα σημείο που αντιστοιχεί στο υπεροξείδιο	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη
200 ppm και 600ppm ρεμπαουδιοσίδης Α σε διάλυμα ακετονιτριλίου/ νερού, 8/2, v/v και 10% υπεροξειδίου	72 ώρες	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη, μόνο ένα σημείο που αντιστοιχεί στο υπεροξείδιο. Στο δείγμα δημιουργείται λευκό ίζημα	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη. Στο δείγμα δημιουργείται λευκό ίζημα
200 ppm και 600ppm ρεμπαουδιοσίδης Α σε διάλυμα ακετονιτριλίου/ νερού, 8/2, v/v και	7 ημέρες	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη, μόνο ένα σημείο που αντιστοιχεί στο υπεροξείδιο. Στο δείγμα	Δεν ανιχνεύεται γλυκόζη. Στο δείγμα δημιουργείται λευκό ίζημα

10% υπεροξειδίου	δημιουργείται λευκό ίζημα
------------------	------------------------------

Πίνακας 4: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα για την οξειδωτική υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης A

Έπειτα από δειγματοληψία στις 8 και στις 72 ώρες επώασης, δεν ανιχνεύθηκε καμία ποσότητα γλυκόζης ούτε ρεμπαουδιοσίδης A στα διαλύματα της ρεμπαουδιοσίδης A, σε κανέναν από τους διαλύτες οι οποίοι δοκιμάστηκαν. Με δεδομένο πως στις 72 ώρες η αποικοδόμηση θα ήταν πλήρης, αναμενόταν να ανιχνεύεται ποσότητα γλυκόζης στις 8 ώρες, ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος της προόδου της αποικοδόμησης. Η επώαση των δειγμάτων συνεχίστηκε ως τις 7 ημέρες, ωστόσο και πάλι δεν ανιχνεύθηκε ποσότητα γλυκόζης ούτε ρεμπαουδιοσίδης A. Στα δείγματα τα οποία παρασκευάστηκαν στον οργανικό διαλύτη, έπειτα από 3 ημέρες παρατηρήθηκε ένα παχύ, λευκό ίζημα.

Με δεδομένο πως η γλυκόζη (αλλά και η ρεμπαουδιοσίδη A) είναι περισσότερο διαλυτή στο νερό από ότι στο ακετονιτρίλιο, το λευκό ίζημα συλλέχθηκε, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε νερό και αναλύθηκε για την ύπαρξη γλυκόζης. Ωστόσο δεν ανιχνεύθηκε γλυκόζη με τη μέθοδο της εξοκινάσης. Στον έλεγχο με TLC ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε ούτε σημείο το οποίο να αντιστοιχεί στη γλυκόζη, ούτε στη ρεμπαουδιοσίδη A. Το μοναδικό σημείο που εντοπίζεται στο δείγμα είναι σημείο το οποίο δε χρωματίζεται μπλε με τη χρώση Hanessian, άγνωστης ταυτότητας.

2.1.4 Οξινή υδρόλυση σε υψηλή θερμοκρασία

2.1.4.1 Υλικά

- ρεμπαουδιοσίδη A καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- θειικό οξύ καθαρότητας 97-101% της εταιρείας Fischer, USA
- οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας analytical grade της εταιρείας Fisher, USA

- μεθανόλη της εταιρίας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρίας Chem lab NV, Belgium
- αναλυτικός ζυγός της εταιρίας KERN 4 δεκαδικών ψηφίων
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl
- υδατόλουτρο της εταιρείας ERMANN
- φωτόμετρο ορατού/ υπεριώδους φωτός της εταιρείας Amersham Biosciences

2.1.4.2 Μέθοδοι

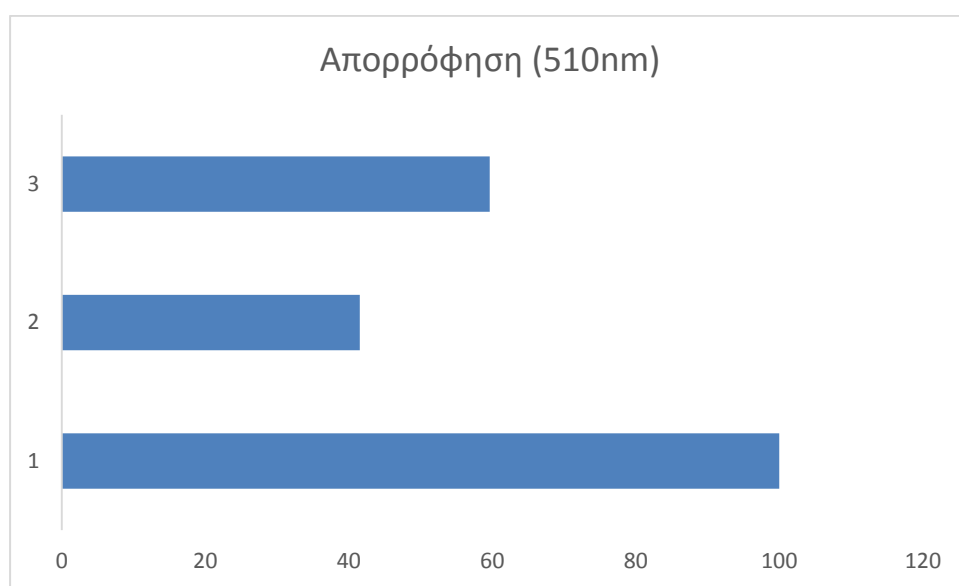
Για την επίτευξη της υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α και την απελευθέρωση γλυκόζης, δοκιμάστηκε η όξινη υδρόλυσή της σε διαλύματα τα οποία υπόκεινται σε έντονη θέρμανση, με σκοπό να αναπαραχθούν οι συνθήκες υπό τις οποίες παρατηρήθηκε υδρόλυση των γλυκοζιτών στεβιόλης σύμφωνα με τη σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση (Pezzuto et al, 1985), (Melis, 1999), (Chaturvedula, 2015). Παρασκευάστηκαν δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α συγκέντρωσης 0.2mg/ml στο διαλύτη ακετονιτριλίο/νερό 8/2, v/v, στα οποία προστέθηκε ποσότητα διαλύματος θεικού οξέος 10% v/v σε νερό, ανά ml διαλύματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο το νερό του οποίου είναι σε βρασμό (περίπου 100 °C) για διάστημα μίας ώρας.

Η υδρόλυση δοκιμάστηκε και σε δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α ίδιας συγκέντρωσης στους διαλύτες νερό και μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v. Ο λόγος είναι πως συνήθως τα πρωτόκολλα εκχύλισης των γλυκοζιτών στεβιόλης από τα φύλλα του φυτού αναφέρουν είτε υδατικά διαλύματα ή διαλύματα με κάποια αναλογία νερού/ αλκοόλης ([Mathur et al, 2017](#)), συνεπώς η ανάπτυξη της μεθόδου ποσοτικοποίησης της ρεμπαουδιοσίδης Α σε διαλύτη ο οποίος είναι όμοιος με το διαλύτη εκχύλισης θα ήταν χρήσιμη για την ανάλυση και των ακατέργαστων εκχυλισμάτων. Μετά την επώαση, η τυχόν ύπαρξη γλυκόζης στα δείγματα προσδιορίστηκε ποσοτικά με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP.

2.1.4.3 Αποτελέσματα

Έπειτα από 60 λεπτά στο υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία βρασμού, στα δείγματα της όξινης υδρόλυσης εντοπίστηκε γλυκόζη με τη μέθοδο GOD/PAP.

Ωστόσο, η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm κατά την ανάλυσή, διέφερε σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων που παρασκευάστηκαν στους 3 διαφορετικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα, στο διαλύτη ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v παρατηρήθηκε σχεδόν η διπλάσια απορρόφηση από ότι στο νερό και στον διαλύτη νερό/μεθανόλη 1/1 v/v. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μειωμένη διαλυτότητα της γλυκόζης και της ρεμπαουδιοσίδης Α στο ακετονιτρίλιο, γεγονός που οδηγεί στην κατανομή τους μόνο στο νερό, με αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση της ρεμπαουδιοσίδης Α και της γλυκόζης σε αυτόν το διαλύτη.



Πίνακας 5: Σύγκριση παρατηρούμενου σήματος της υδρόλυσης σε κάθε διαλύτη. Η μπάρα 1 αντιστοιχεί στο διαλύτη ακετονιτρίλιου, η 2^η στο μεθανολικό διαλύτη και η 3^η στον υδατικό διαλύτη.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, διερευνήθηκε η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης ρεμπαουδιοσίδης Α στα δείγματα και της απορρόφησης στα 510 nm με τη μέθοδο GOD/PAP, έπειτα από την όξινη υδρόλυση των δειγμάτων στους 100 °C και στο διαλύτη ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v, στον οποίο διαλύτη η υδρόλυση δείχνει να προχωρά σε μεγαλύτερο βαθμό. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε stock διάλυμα ρεμπαουδιοσίδης Α συγκέντρωσης 0.2 mg/ml στον οργανικό διαλύτη από το οποίο έγιναν οι αραιώσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Δείγματα	Stock διάλυμα ρεμπαουδιοσίδης Α 0.2mg/ml (μl)	Οργανικός διαλύτης (μl)	Διάλυμα θεικού οξέος 10%	Τελική συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης
----------	-----------------------------------------------------	----------------------------	--------------------------------	------------------------------------------

			v/v (μl)	A (mg/ml)
1	1000	0	150	0.17
2	800	200	150	0.14
3	600	400	150	0.10
4	400	600	150	0.07
5	200	800	150	0.03
6	100	900	150	0.02
7	0	1000	150	0
Blank δείγμα χωρίς θέρμανση	0	1000	150	0
Standard δείγμα γλυκόζης χωρίς θέρμανση 10 mg/dl	0	1000	150	0

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις δειγμάτων για τη διερεύνηση της γραμμικής συσχέτισης συγκέντρωσης ρεμπαουδιοσίδης A και ανίχνευσης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP έπειτα από όξινη υδρόλυση και θέρμανση

Τα δείγματα τα οποία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα 6 τοποθετήθηκαν στο υπό βρασμό νερό του υδατόλουτρου για 60 λεπτά (εκτός από τα δείγματα τα οποία αναφέρεται στον πίνακα 6 πως δε θα θερμανθούν) και έπειτα αναλύθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit της ενζυματικής μεθόδου GOD/PAP, με τη διαφορά πως προστέθηκαν 100 μl δείγματος ανά ml διαλύματος εργασίας (το πρωτόκολλο προτείνει 10 μl δείγματος ανά ml διαλύματος εργασίας). Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης στα δείγματα υδρόλυσης ως προς το standard δείγμα γλυκόζης που περιγράφεται στον πίνακα 7. Επιπλέον, υπολογίστηκε και το ποσοστό της υδρόλυσης.

Δείγματα	Απορρόφηση (510nm)	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/dl)	ποσότητα παραγόμενης	ποσότητα αναμενόμενης	% Υδρόλυσης
----------	--------------------	------------------------------	----------------------	-----------------------	-------------

			γλυκόζης (Moles/dl)	γλυκόζης (Moles/dl)	
1	0.346	0.958	0.0053	0.0072	74.0
2	0.304	0.811	0.0045	0.0058	78.3
3	0.246	0.608	0.0033	0.0043	78.3
4	0.196	0.434	0.0024	0.0029	83.7
5	0.124	0.182	0.0010	0.0014	70.2
6	0.098	0.091	0.0005	0.0007	70.2
7	0.072	0	0	0	(-)
Standard δείγμα γλυκόζης χωρίς θέρμανση η 10 mg/dl	0.358	1	(-)	(-)	(-)

Πίνακας 7: Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α υπό θέρμανση

Με βάση τα δεδομένα του πίνακα 7, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση με θέρμανση και ανάλυση με τη μέθοδο GOD/PAP. Επιπλέον υπολογίστηκε ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης (R^2) ώστε να προσδιοριστεί η αξιοπιστία της μεθόδου. Όταν η τιμή του συντελεστή είναι μεγαλύτερη του 0.99, η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε, ο οποίος σε αυτή την περίπτωση είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α.



Εικόνα 6: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση με θέρμανση και ανάλυση με τη μέθοδο GOD/PAP

2.2 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου TLC για την ανίχνευση της ρεμπαουδιοσίδης Α και του προϊόντος της υδρόλυσής αυτής, γλυκόζης

2.2.1 Υλικά

- ρεμπαουδιοσίδη Α σε καθαρότητα 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας analytical grade της εταιρίας Fischer, USA
- μεθανόλη της εταιρίας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρίας Chem lab NV, Belgium
- χλωροφόρμιο της εταιρίας Fischer, USA και καθαρότητας analytical grade
- διχλωρομεθάνιο καθαρότητας analytical grade της εταιρίας CARLO ERBA, France
- πλάκες TLC με επίστρωση silica και φθορίζοντα δείκτη UV254 της εταιρείας Merck
- θειικό οξύ καθαρότητας 97-101% της εταιρείας Fischer, USA

- μολυβδαινικό αμμώνιο τετραϋδρικό της εταιρίας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- εναμμώνιο θειικό δημήτριο της εταιρίας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- λάμπα υπεριώδους φωτός που εκπέμπει σε μήκος κύματος 254 nm
- αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων εταιρείας KERN

2.2.2 Μέθοδοι

Για την ανάπτυξη του βέλτιστου πρωτοκόλλου για την TLC ανίχνευση της γλυκόζης η οποία θα απελευθερώνεται από την υδρόλυση των μορίων της ρεμπαουδιοσίδης Α, δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές κινητές φάσεις και 2 διαφορετικοί τρόποι ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, μιας και η γλυκόζη απορροφά ασθενώς στα 254 nm, δοκιμάστηκε η ανίχνευσή της με απλή τοποθέτηση της χρωματογραφικής πλάκας κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός έπειτα από την ανάπτυξή της. Το σημείο το οποίο αντιστοιχεί στη γλυκόζη έπειτα από την ανάπτυξη της πλάκας εμφανίζεται σαν σκουρόχρωμη κηλίδα σε ένα φθορίζον φόντο.

Επιπλέον, δοκιμάστηκε η χρώση της χρωματογραφικής πλάκας με τη χρωστική μπλε του Hanessian ή αλλιώς χρωστική του εναμμώνιου θειικού δημητρίου, η οποία είναι μια ευαίσθητη, οξειδωτική χρώση η οποία ενδείκνυται για την ανίχνευση αναγωγικών ενώσεων, όπως η γλυκόζη. Έπειτα από την εφαρμογή της στην πλάκα απαιτείται έντονη θέρμανση σε θερμοκρασία περίπου 100 °C έως ότου να εμφανιστούν τα σημεία με σκούρο μπλε χρώμα σε ανοιχτόχρωμο γαλάζιο φόντο (περίπου 10 λεπτά). Οι κινητές φάσεις οι οποίες δοκιμάστηκαν με σκοπό την επίτευξη του καλύτερου διαχωρισμού μεταξύ των προς ανάλυση γλυκοζιτών διαφέρουν σε πολικότητα (Wolwer- Rieck, 2018), (Morlock et al, 2014) και είναι οι εξής:

1. οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη/ νερό σε αναλογία 7/2/1 v/v/v
2. χλωροφόρμιο/ μεθανόλη / νερό σε αναλογία 15/10/2 v/v/v
3. διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη σε αναλογία 9/1 v/v

Για την προετοιμασία της χρωστικής Hanessian, παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα 2.5% w/v τετραϋδρικού μολυβδαινικού αμμωνίου, 1% w/v εναμμώνιου θειικού δημητρίου και 10% v/v θειικού οξέος. Ζυγίζονται 2.5g τετραϋδρικού

μολυβδαινικού αμμωνίου και 1g εναμμώνιου θεικού δημητρίου και αναδεύονται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου. Αφού ομογενοποιηθούν, προστίθεται στο μίγμα τους (υπό ανάδευση) 10 ml πυκνού θεικού οξέος και αφήνονται να αναδευτούν για μερικά λεπτά. Λαμβάνοντας όλες τις απαραίτητες προφυλάξεις, στο διάλυμα προστίθενται σταδιακά 90 ml απιονισμένου νερού.

Μόλις το διάλυμα γίνει διαυγές και διαλυθεί όλη η ποσότητα των στερεών, σταματά η ανάδευση και η χρωστική φυλάσσεται σε κλειστό περιέκτη. Το χρώμα του τελικού διαλύματος είναι έντονο κίτρινο. Μετά την ανάπτυξη και αφότου η χρωματογραφική πλάκα έχει αφεθεί να στεγνώσει σε ρεύμα αέρα, ψεκάζεται ομοιογενώς με το διάλυμα της χρωστικής και αφήνεται να στεγνώσει. Έπειτα, θερμαίνεται στους 100 °C σε φούρνο για περίπου 10 λεπτά για την εμφάνιση των σημείων. Ελέγχθηκε αν με τη συγκεκριμένη χρώση χρωματίζεται και το σημείο της ρεμπαουδιοσίδης Α, ώστε να ελεγχθεί ο διαχωρισμός τους.

2.2.3 Αποτελέσματα

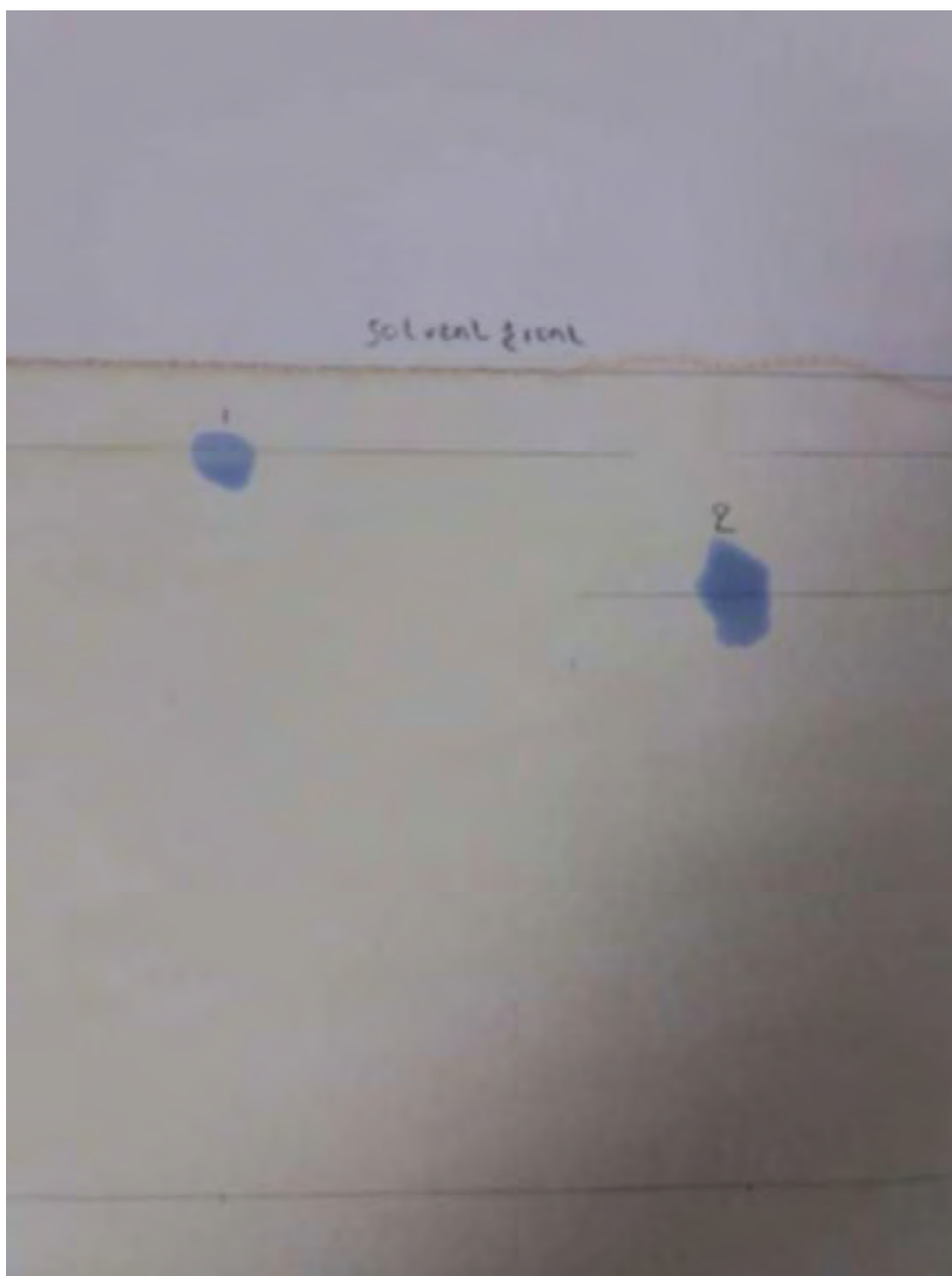
Κινητή φάση	Ανίχνευση	Συγκέντρωση δειγμάτων	Διαλύτης	Όγκος Εφαρμογή ς δείγματος	Αποτελέσματα
1 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 58)	Λάμπα UV	2.5, 1.0 και 0.5 mg/ml διαλύματα γλυκόζης και ρεμπαουδιοσίδη ς Α	Μεθανόλη / νερό σε αναλογία 4/1 v/v	1, 5 και 10μl	Πολύ αχνά σημεία κακού σχήματος, εμφάνιση ουράς, ανεπιτυχής διαχωρισμός
2 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 58)	Λάμπα UV	2.5, 1.0 και 0.5 mg/ml διαλύματα γλυκόζης και ρεμπαουδιοσίδη ς Α	Μεθανόλη / νερό σε αναλογία 4/1 v/v	1, 5 και 10μl	Πολύ αχνά σημεία κακού σχήματος, εμφάνιση ουράς, ανεπιτυχής διαχωρισμός

3 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 58)	Λάμπα UV	2.5, 1.0 και 0.5 mg/ml διαλύματα γλυκόζης και ρεμπαουδιοσίδη ς A	Μεθανόλη / νερό σε αναλογία 4/1 v/v	1, 5 και 10μl	Πολύ αγνά σημεία κακού σχήματος, εμφάνιση ουράς, ανεπιτυχής διαχωρισμός
1 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 58)	Χρώση Hanessia n	2.5, 1.0 και 0.5 mg/ml διαλύματα γλυκόζης και ρεμπαουδιοσίδη ς A	Μεθανόλη / νερό σε αναλογία 4/1 v/v	1, 5 και 10μl	Πολύ καλό σχήμα και διαχωρισμός των σημείων με διαλύματα συγκέντρωσης 0.5 mg/ml και εφαρμογή 1 μl
2 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 58)	Χρώση Hanessia n	2.5, 1.0 και 0.5 mg/ml διαλύματα γλυκόζης και ρεμπαουδιοσίδη ς A	Μεθανόλη / νερό σε αναλογία 4/1 v/v	1, 5 και 10μl	Σημεία κακού σχήματος, ανεπιτυχής διαχωρισμός
3 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 58)	Χρώση Hanessia n	2.5, 1.0 και 0.5 mg/ml διαλύματα γλυκόζης και ρεμπαουδιοσίδη ς A	Μεθανόλη / νερό σε αναλογία 4/1 v/v	1, 5 και 10μl	Σημεία κακού σχήματος, ανεπιτυχής διαχωρισμός

Πίνακας 8: Πειραματικές συνθήκες και αποτελέσματα για την ανάπτυξη TLC πρωτοκόλλου προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδη ς A και γλυκόζης

Έπειτα από τη διερεύνηση των παραπάνω συνθηκών, διαπιστώθηκε πως η καταλληλότερη κινητή φάση για τον επιτυχή διαχωρισμό της γλυκόζης και της ρεμπαουδιοσίδη ς A είναι η κινητή φάση 1 (οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη/ νερό σε

αναλογία 7/2/1 v/v/v), όπως φαίνεται στην εικόνα 7. Ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων είναι απαραίτητος, καθώς το συγκεκριμένο πρωτόκολλο προτείνεται για την παρακολούθηση της υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α μέσω της απελευθέρωσης γλυκόζης, οπότε θα πρέπει να είναι ξεκάθαρο το ποια ένωση ανιχνεύεται. Ως προς την ανίχνευση έπειτα από την ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας, καταλληλότερη κρίνεται η χρώση Hanessian (εικόνα 7), καθώς τα δύο γλυκαντικά δεν απορροφούν ισχυρά στα 254nm με αποτέλεσμα να μην υπάρχει καλή χρωματογραφική εικόνα υπό UV φως.



Εικόνα 7: Χρωματογράφημα ανεπτυγμένο με το προτεινόμενο πρωτόκολλο TLC με την κινητή φάση 1 και χρώση Hanessian. Η κηλίδα με το νούμερο 1 αντιστοιχεί στη γλυκόζη και η κηλίδα με το νούμερο 2 αντιστοιχεί στη ρεμπαουδιοσίδη Α

Το σημείο της ρεμπαουδιοσίδης Α (η οποία δεν είναι ανάγων σάκχαρο) χρωματίζεται μπλε με τη χρωστική Hanessian, επειδή με την προσθήκη της χρωστικής η οποία είναι 10% v/v διάλυμα θεικού οξέος και τη μετέπειτα θέρμανσή της στους 100 °C, επιτυγχάνεται μερική υδρόλυσή της και η γλυκόζη που προκύπτει οδηγεί στο μπλε χρωματισμό του σημείου.

Καθώς η TLC είναι κατάλληλη μόνο για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό αναλυτών, αλλά και λόγω της κοντινής τιμής R_f της σακχαρίνης και της ρεμπαουδιοσίδης Α, αναμένεται αδυναμία διαχωρισμού/ ποσοτικού προσδιορισμού μεταξύ των κηλίδων μείγματος ρεμπαουδιοσίδης Α με νοθεία σακχαρίνης, καθώς η ρεμπαουδιοσίδη Α σε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση θα δίνει ευρεία κηλίδα με ουρά, και η σακχαρίνη, σε μικρότερη συγκέντρωση θα δίνει μικρότερη κηλίδα, η οποία πιθανώς θα εντοπίζεται εντός της ουράς. Για τους παραπάνω λόγους δεν διερευνήθηκε η καταλληλότητα του πρωτοκόλλου για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γλυκοζιτών στεβιόλης και της σακχαρίνης.

2.3 Πρόσθετες μέθοδοι προσδιορισμού της συγκέντρωσης ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση

Τα αποτελέσματα της όξινης υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α υπό θέρμανση μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της, μέσω του προσδιορισμού της απελευθερωμένης γλυκόζης, εκτός από τη μέθοδο GOD/PAP. Οι μέθοδοι που προτείνονται είναι η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και η αντίδραση των δειγμάτων με τη χρωστική Hanessian, όπως αυτή περιγράφεται στην ενότητα 2.1. Στη μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού

οξέος η παραγωγή έγχρωμου προϊόντος και ο φωτομετρικός προσδιορισμός του χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης.

Η ~~παρα~~ αντίδραση με τη χρωστική Hanessian, η οποία επίσης οδηγεί σε σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος, μπορεί να αξιοποιηθεί για το φωτομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης. Επιπλέον, επειδή και στις δύο μεθόδους απαιτείται έντονη θέρμανση (περίπου στους 100 °C) των δειγμάτων για την ανάπτυξη του χρώματος, η υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α και η προσδιορισμός της γλυκόζης θα μπορούσε να γίνει στο ίδιο διάλυμα, με προσθήκη τόσο του θεικού οξέος όσο του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος ή της χρωστικής Hanessian αντίστοιχα στα δείγματα της ρεμπαουδιοσίδης Α πριν την επώαση στους 100 °C. Συνεπώς, η ρεμπαουδιοσίδη Α θα μπορούσε να προσδιοριστεί σε ένα βήμα αντί για δύο.

2.3.1 Μέθοδος 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος

2.3.1.1 Υλικά

- 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ της εταιρείας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας analytical grade
- θειώδες νάτριο της εταιρείας Lachner, Check Republic και καθαρότητας reagent grade
- τρυγικό νάτριο κάλιο της εταιρείας Lachner, Check Republic και καθαρότητας reagent grade
- υδροξείδιο του νατρίου της εταιρείας Lachner, Check Republic και καθαρότητας reagent grade
- θεικό οξύ της εταιρείας Fischer, USA και καθαρότητας 97-101%
- ρεμπαουδιοσίδη Α καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- μεθανόλη της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων εταιρείας KERN
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl

- υδατόλουτρο της εταιρείας ERMANN
- φωτόμετρο ορατού/ υπεριώδους φωτός της εταιρείας Amersham Biosciences

2.3.1.2 Μέθοδος

Κατά τη μέθοδο του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, διάλυμα 1% δινιτροσαλικυλικού οξέος αναμιγνύεται σε αναλογία 1/1 v/v με το διάλυμα του οποίου η ποσότητα γλυκόζης θα προσδιοριστεί ποσοτικά. Στη συνέχεια, το διάλυμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 100 °C για 5 ως 15 λεπτά, μέχρι την ανάπτυξη σκουρόχρωμου κόκκινου ως καφέ χρώματος (το αρχικό διάλυμα 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος έχει ανοιχτόχρωμο πορτοκαλί χρώμα). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτό διάλυμα τρυγικού νατρίου καλίου 40% (σε αναλογία 1ml προς 6 ml δείγματος), για τη σταθεροποίηση του χρώματος.

Το διάλυμα 1% δινιτροσαλικυλικού οξέος παρασκευάζεται με προσθήκη 10g 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος, 0.5g θειώδους νατρίου και 10g υδροξειδίου του νατρίου σε νερό και αραιώση ως το 1 λίτρο με νερό. Έπειτα από την ανάπτυξη του χρώματος, καταγράφεται η απορρόφηση στα 540 nm (Wang, n.d.). Η υδρόλυση και ο μετέπειτα προσδιορισμός της γλυκόζης δοκιμάστηκε και στους διαλύτες νερό και μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, για τους λόγους που αναπτύχθηκαν στην ενότητα 2.2.4.2. Τα δείγματα παρέμειναν στο υδατόλουτρο στους 100 °C για 70 λεπτά, ώστε να υδrolυθεί η ρεμπαουδιοσίδη Α και η απελευθερωμένη γλυκόζη να δώσει την αντίδραση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς την παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος.

2.3.1.3 Αποτελέσματα

Συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης Α (ppm)	Διαλύτης	Αποτέλεσμα	Απορρόφηση (540nm)
75	Ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)

100	Ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
150	Ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
300	Ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v	Ανάπτυξη χρώματος, εμφάνιση γέλης	0.366
500	Ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v	Ανάπτυξη χρώματος, εμφάνιση γέλης	1.112
75	Νερό	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
100	Νερό	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
150	Νερό	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
300	Νερό	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
500	Νερό	Ανάπτυξη χρώματος	0.756
75	Μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
100	Μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)

150	Μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
300	Μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Χωρίς ανάπτυξη χρώματος	(-)
500	Μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Ανάπτυξη χρώματος	0.652

Πίνακας 9: Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α με τη μέθοδο του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος

Έπειτα από 70 λεπτά στους 100 °C, στις περισσότερες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος. Στις συγκεντρώσεις στις οποίες παρατηρήθηκε μικρή αλλαγή χρώματος, η απορρόφηση δεν δείχνει να έχει καθόλου γραμμική σχέση με τη συγκέντρωση της ρεμπαουδιοσίδης Α. Επιπλέον, στον διαλύτη ακετονιτριλίου/ νερού 8/2 v/v τα δείγματα έπειτα από τη θέρμανση απέκτησαν μορφή γέλης και έγιναν παχύρευστα, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να θεωρηθεί ακριβής η μέτρηση της απορρόφησης τους.

Επιπρόσθετα, τυφλό διάλυμα το οποίο παρασκευάστηκε χωρίς προσθήκη ρεμπαουδιοσίδης Α και χωρίς θέρμανση είχε απορρόφηση 0.325 στα 540 nm, γεγονός που σημαίνει πως η απορρόφηση του background είναι αρκετά υψηλή και δε θα επέτρεπε την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης που θα οδηγούσαν σε μικρή αύξηση της απορρόφησης. Παράλληλα, η μέθοδος του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος επίσης απαιτεί την απομάκρυνση τυχόν ποσότητας γλυκόζης η οποία προϋπάρχει στα δείγματα για τον προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α, όπως και η μέθοδος GOD/PAP, η οποία όμως είναι περισσότερο γρήγορη και οικονομική (λόγω της ύπαρξης κιτ). Λόγω των παραπάνω μειονεκτημάτων, δεν πραγματοποιήθηκαν παραπάνω δοκιμές με τη μέθοδο του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος.

2.3.2 Μέθοδος χρωστικής Hanessian για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α

2.3.2.1 Υλικά

- θειικό οξύ της εταιρείας Fischer, USA και καθαρότητας 97-101%

- ρεμπαουδιοσίδη Α και καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- μολυβδαινικό αμμώνιο τετραϋδρικό της εταιρείας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- εναμμόνιο θειικό δημήτριο SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας reagent grade
- αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων εταιρείας KERN
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl
- Υδατόλουτρο της εταιρείας ERMANN

2.3.2.2 Μέθοδος

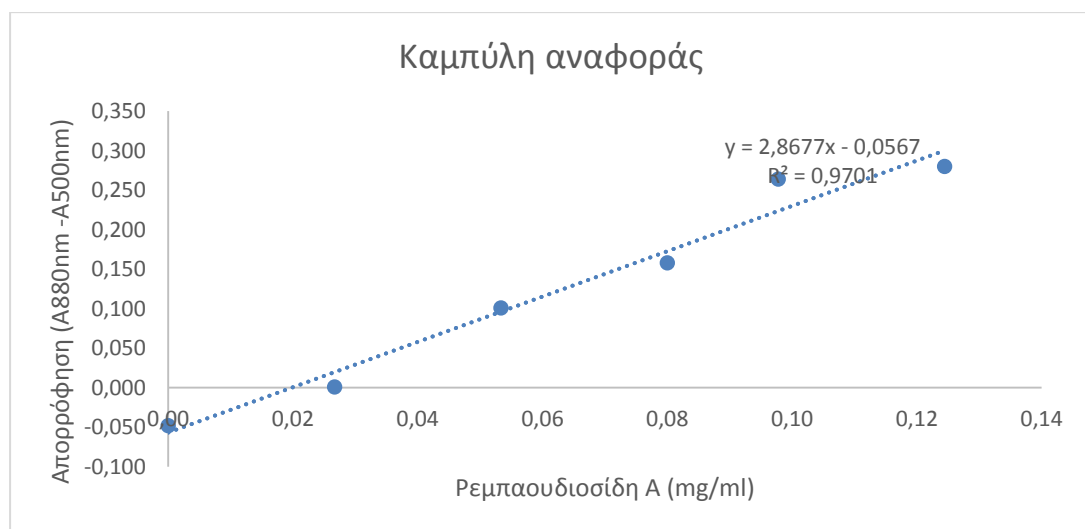
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α με τη βοήθεια της χρωστικής Hanessian, παρασκευάστηκε stock διάλυμα ρεμπαουδιοσίδης Α συγκέντρωσης 0.2 mg/ml σε νερό και ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v. Στα stock διαλύματα προστέθηκε διάλυμα 10% v/v θειικού οξέος, σε αναλογία 150 μl/ml stock διαλύματος. Επίσης προστέθηκαν 125 μl χρωστικής Hanessian ανά ml stock διαλύματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα παρέμειναν στο υδατόλουτρο σε νερό υπό βρασμό για 50 λεπτά. Μετά τα 50 λεπτά και αφού τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 500 και 800 nm. Ως τελική απορρόφηση κρατήθηκε η διαφορά της απορρόφησης στα 800 nm μείον την απορρόφηση στα 500 nm, καθώς στα 800 nm απορροφά το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης, ενώ στα 500 nm η τυχόν περίσσεια της χρωστικής η οποία εξακολουθεί να έχει κίτρινο χρώμα.

2.3.2.3 Αποτελέσματα

Στα δείγματα με το νερό ως διαλύτη, δεν αναπτύχθηκε μπλε χρώμα. Ωστόσο, στο δείγμα με το διαλύτη ακετονιτρίλιου αναπτύχθηκε μπλε χρώμα και για αυτό το λόγο διερευνήθηκε η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α με την αύξηση της απορρόφησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Επιπλέον κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς και υπολογίστηκε ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης (R^2) ώστε να προσδιοριστεί η αξιοπιστία της μεθόδου.

Stock διάλυμα ρεμπαουδιοσίδης A, 0.2 mg/ml σε ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v (μl)	Διαλύτης (ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v) (μl)	Χρωστική Hanessian (μl)	Τελική συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης A (mg/ml)	Απορρόφηση (A800nm- A500nm)
700	300	125	0.12	0.280
550	450	125	0.10	0.264
450	550	125	0.08	0.158
300	700	125	0.05	0.101
150	850	125	0.03	0.001
0	1000	125	0	-0.048

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης A με όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση και τη χρωστική Hanessian



Εικόνα 8: Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης A έπειτα από όξινη υδρόλυση με θέρμανση και ανάλυση με τη χρωστική Hanessian

Τα αποτελέσματα του συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης δείχνουν πως αν και η μέθοδος θα μπορούσε να λειτουργήσει για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης A, η μέθοδος της όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση και ποσοτικοποίησης με τη ενζυματική μέθοδο GOD/PAP είναι καταλληλότερη. Επιπλέον, η μέθοδος GOD/PAP οδηγεί σε παραγωγή προϊόντος το οποίο απορροφά σε ένα μήκος κύματος και χρειάζεται η απλή καταγραφή της συγκεκριμένης απορρόφησης. Στην ποσοτικοποίηση με τη χρωστική Hanessian απαιτείται η

αφαίρεση της απορρόφησης κάποιου από τα αντιδρώντα από την απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος, γεγονός που κάνει τη μέθοδο περισσότερο πολύπλοκη και χρονοβόρα. Συνεπώς, κρίνεται πως η ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο GOD/PAP έπειτα από την όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση είναι η προτιμότερη μέθοδος.

2.4 Διαχείριση προ υπάρχουσας γλυκόζης σε δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α προς ανάλυση

Έπειτα από την επιτυχημένη υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α και της ποσοτικοποίησής της μέσω της ποσοτικοποίησης της γλυκόζης η οποία απελευθερώνεται, διερευνήθηκε το πως θα διαχειρίζονται δείγματα τα οποία περιέχουν τόσο ρεμπαουδιοσίδα Α όσο και γλυκόζη, όπως είναι πιθανό να συμβαίνει σε γλυκαντικά προϊόντα. Αρχικά ελέγχθηκε το αν η συγκέντρωση της γλυκόζης παραμένει σταθερή στα δείγματα έπειτα από την προσθήκη διαλύματος 10% v/v θεικού οξέος και θέρμανση στους 100 °C για μία ώρα. Αν η συγκέντρωση της γλυκόζης παραμένει σταθερή στις συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση, τότε η διαφορά της αρχικής ποσότητας γλυκόζης από την τελική είναι η ποσότητα η οποία αντιστοιχεί στη ρεμπαουδιοσίδα Α. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η απομάκρυνση της αρχικής ποσότητας γλυκόζης με τη μέθοδο της [εξοκινάσης της γλυκόζης/δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης](#), πριν την όξινη υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α.

2.4.1 Διερεύνηση της σταθερότητας της γλυκόζης στις συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση

2.4.1.1 Υλικά

- Γλυκόζη της εταιρείας Mallinckrodt και καθαρότητας reagent grade
- Θεικό οξύ της εταιρείας Fischer, USA και καθαρότητας 97-101%
- Υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- Μεθανόλη της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- Ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- κιτ GOD/PAP για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης της εταιρείας Biosis, Αθήνα

- Υδατόλουτρο της εταιρείας ERMANN
- αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων εταιρείας KERN
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl

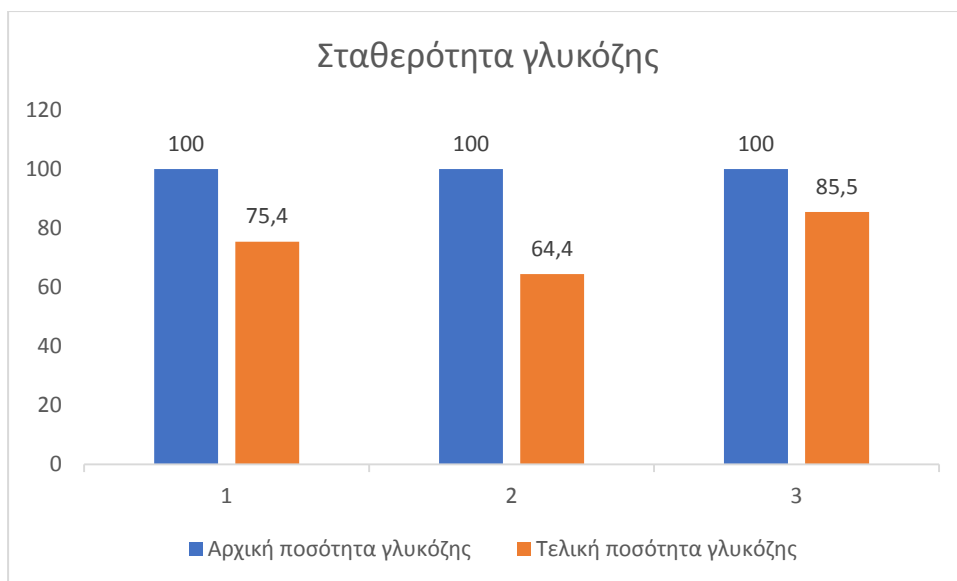
2.4.1.2 Μέθοδος

Παρασκευάστηκαν διαλύματα γλυκόζης συγκέντρωσης 300 ppm στους διαλύτες νερό, ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v και μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, για τους λόγους που αναπτύχθηκαν στην ενότητα 2.1.4.2. Στα δείγματα προστέθηκε διάλυμα θεικού οξέος 10% v/v σε αναλογία 150 μl ανά ml δείγματος. Στη συνέχεια τα δείγματα παρέμειναν για μία ώρα σε υδατόλουτρο το νερό του οποίου ήταν σε βρασμό. Η ποσοτικοποίηση της γλυκόζης έγινε με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP, σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Ως controls χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης στα οποία είχε προστεθεί η ίδια ποσότητα θεικού οξέος αλλά δεν είχαν υποστεί θέρμανση. Παρασκευάστηκε ένα control διάλυμα ανά διαλύτη.

2.4.1.3 Αποτελέσματα

Διαλύτες	Νερό	Μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v
Γλυκόζη (mg/ml) δειγμάτων	0.35	0.27	0.42
Γλυκόζη (mg/ml) controls	0.46	0.52	0.50
Ποσοστό γλυκόζης τελικών δειγμάτων ως προς control	75.4	64.4	85.5

Πίνακας 11: Αποτελέσματα σταθερότητας γλυκόζης σε όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση



Εικόνα 9: Μείωση συγκέντρωσης γλυκόζης σε συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση (1: νερό, 2: μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, 3: ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v)

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης της επίδρασης των συνθηκών της όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση στη συγκέντρωση της γλυκόζης, έδειξαν πως η γλυκόζη μειώνεται σημαντικά σε σχέση με την αρχική της συγκέντρωση. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρείται και στους 3 διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν. Συνεπώς, η διαφορά στη συγκέντρωση της γλυκόζης πριν και μετά την υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α δε θα αντιπροσώπευε μόνο την ποσότητα γλυκόζης η οποία αντιστοιχεί στη ρεμπαουδιοσίδα Α, συνεπώς η συγκεκριμένη μεθοδολογία δεν είναι κατάλληλη για τη διαχείριση δειγμάτων στα οποία προϋπάρχει γλυκόζη.

2.4.2 Απομάκρυνση συνυπάρχουσας γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης της γλυκόζης/ δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης

2.4.2.1 Υλικά

- Γλυκόζη της εταιρείας Mallinckordt και καθαρότητας reagent grade
- Υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- Μεθανόλη της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- Ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων εταιρείας KERN

- αυτόματες πιπέτες εταιρίας Orange Scientific 100-1000μl
- κιτ εξοκινάσης της εταιρείας Medicon, Αθήνα
- κιτ GOD/PAP μεθόδου της εταιρείας Biosis, Αθήνα
- υδατόλουτρο εταιρείας ERMANN

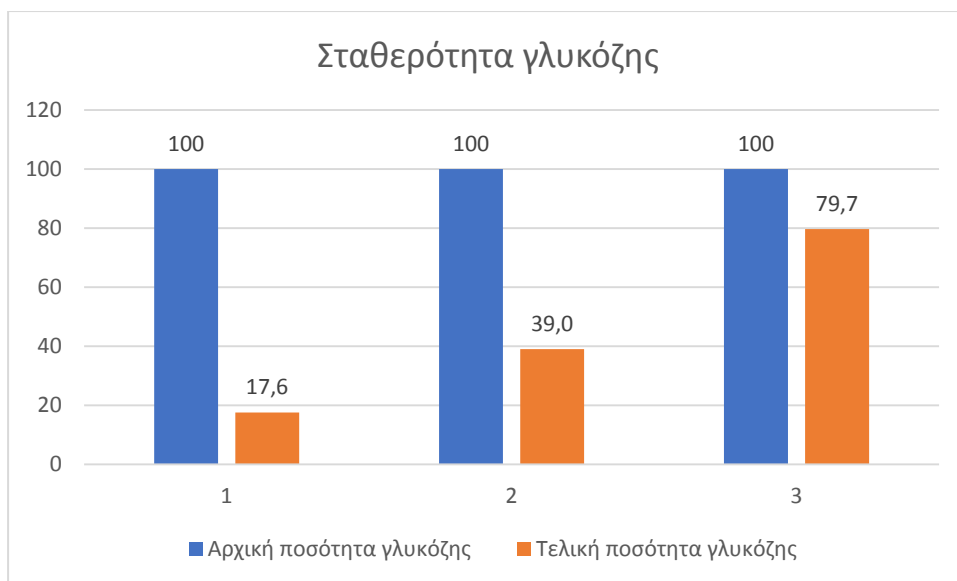
2.4.2.2 Μέθοδος

Παρασκευάστηκαν διαλύματα γλυκόζης συγκέντρωσης 300 ppm στους διαλύτες νερό, ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v και μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, για τους λόγους που αναπτύχθηκαν στην ενότητα 2.1.4.2. Στα διαλύματα προστέθηκε το διάλυμα εργασίας του κιτ της εξοκινάσης, το οποίο είναι ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τα ένζυμα της εξοκινάσης της γλυκόζης και της δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης, σε αναλογία 500μl ανά ml διαλύματος γλυκόζης. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C και η εναπομένουσα ποσότητα της γλυκόζης προσδιορίστηκε έπειτα από 10, 20 και 30 λεπτά επώασης. Η ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης έγινε με την ενζυματική μέθοδο GOD/PAP, σύμφωνα με τις οδηγίες του κιτ.

2.4.2.3 Αποτελέσματα

Χρόνος επώασης	Ποσοστό γλυκόζης/ Δείγμα σε νερό	Ποσοστό γλυκόζης/ Δείγμα σε μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v	Ποσοστό γλυκόζης/ Δείγμα σε ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v
0 min	100%	100%	100%
10 min	25.5%	54.1%	95.9%
20 min	27.8%	44.5%	102.7%
30 min	17.6%	39.0%	79.7%

Πίνακας 12: Αποτελέσματα σταθερότητας γλυκόζης έπειτα από επώαση με κιτ εξοκινάσης



Εικόνα 10: Μείωση συγκέντρωσης γλυκόζης έπειτα από επώαση με κιτ εξοκινάσης (1: νερό, 2: μεθανόλη/ νερό 1/1 v/v, 3: ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v)

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης της απομάκρυνσης της γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης, έδειξαν πως η γλυκόζη μειώνεται σημαντικά σε σχέση με την αρχική της συγκέντρωση. Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρείται και στους 3 διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν. Ωστόσο, στο δείγμα σε νερό παρατηρείται η μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, καθώς είναι μεγαλύτερη του 80%. Η γλυκόζη απομακρύνεται σε ποσοστό περίπου 60% στο μεθανολικό διαλύτη, ενώ στο διαλύτη ακετονιτρίλιου απομακρύνεται μόνο σε ποσοστό περίπου 20%. Η πλήρης απομάκρυνση της γλυκόζης από τα δείγματα πιθανώς να ήταν δυνατή σε υδατικό διάλυμα με μεγαλύτερη συγκέντρωση των ενζύμων από εκείνη η οποία μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση του κιτ της εξοκινάσης (αν δηλαδή ήταν διαθέσιμα τα ένζυμα σε καθαρή μορφή και όχι σε διάλυμα).

2.4.3 Απομάκρυνση συνυπάρχουσας γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης της γλυκόζης/ δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης και επακόλουθος ποσοτικός προσδιορισμός της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση

2.4.3.1 Υλικά

- Γλυκόζη της εταιρείας Mallinckrodt και καθαρότητας reagent grade

- Ρεμπαουδιοσίδη Α καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- Θεικό οξύ της εταιρείας Fischer, USA και καθαρότητας 97-101%
- Υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- Μεθανόλη της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- Ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- αναλυτικός ζυγός 4 δεκαδικών ψηφίων εταιρείας KERN
- αυτόματες πιπέτες εταιρείας Orange Scientific 100-1000μl
- κιτ εξοκινάσης της εταιρείας Medicon, Αθήνα
- κιτ GOD/PAP μεθόδου της εταιρείας Biosis, Αθήνα
- υδατόλουτρο εταιρείας ERMANN

2.4.3.2 Μέθοδοι

Παρασκευάστηκαν διαλύματα τα οποία περιείχαν γλυκόζη σε συγκέντρωση 300 ppm και ρεμπαουδιοσίδη Α σε αναλογίες συγκεντρώσεων γλυκόζης/ρεμπαουδιοσίδης Α: 0.7/1, 1/1, 1.3/1 και 2/1 σε νερό (μιας και στα υδατικά διαλύματα επιτυγχάνεται μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης, ενότητα 2.4.2.3). Στα διαλύματα προστέθηκε το διάλυμα εργασίας του κιτ της εξοκινάσης, το οποίο είναι ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τα ένζυμα της εξοκινάσης της γλυκόζης και της δεϋδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης, σε αναλογία 500μl ανά 500μl διαλύματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 45 λεπτά. Έπειτα ελέγχθηκε η συγκέντρωση της γλυκόζης η οποία παρέμεινε στα δείγματα μετά την επώαση, με τη μέθοδο GOD/PAP. Στα ίδια δείγματα προστέθηκε στη συνέχεια διάλυμα θειικού οξέος και παρέμειναν στους 100 °C για μια ώρα.

Μετά το πέρας της όξινης υδρόλυσης, υπολογίστηκε η ποσότητα της ρεμπαουδιοσίδης Α στα δείγματα μέσω του προσδιορισμού της απελευθερωμένης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP. Επιπλέον, υπολογίστηκε και το ποσοστό της υδρόλυσης της ρεμπαουδιοσίδης Α στα υδατικά διαλύματα και κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για τη διερεύνηση της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α και του παρατηρούμενου σήματος

απορρόφησης στα 510nm, έπειτα από επώαση των δειγμάτων με εξοκινάση και όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση.

2.4.3.3 Αποτελέσματα

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ενότητας 2.4.2.3 και παρουσία εξοκινάσης σε μεγαλύτερη αναλογία ως προς τη γλυκόζη, παρατηρείται πολύ σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε νερό, της τάξης του 100%. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί με βάση το γεγονός πως χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα χαμηλότερης συγκέντρωσης γλυκόζης, υψηλότερης συγκέντρωσης εξοκινάσης και επώαστηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τη μέθοδο της ενότητας 2.4.2.3.

Συγκέντρωση γλυκόζης (ppm)	Συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης A (ppm)	Αναλογία συγκεντρώσεων γλυκόζης/ ρεμπαουδιοσίδης A	Διάλυμα εργασίας μεθόδου εξοκινάσης (μl/ml διαλύματος)	Απορρόφηση (510nm)
150	150	1/1	500	0.000
100	150	0.7/1	500	0.000
150	75	2/1	500	0.000
100	75	1.3/1	500	0.011

Πίνακας 13: Αποτελέσματα προσδιορισμού γλυκόζης έπειτα από επώαση 45 λεπτών με το διάλυμα εργασίας εξοκινάσης

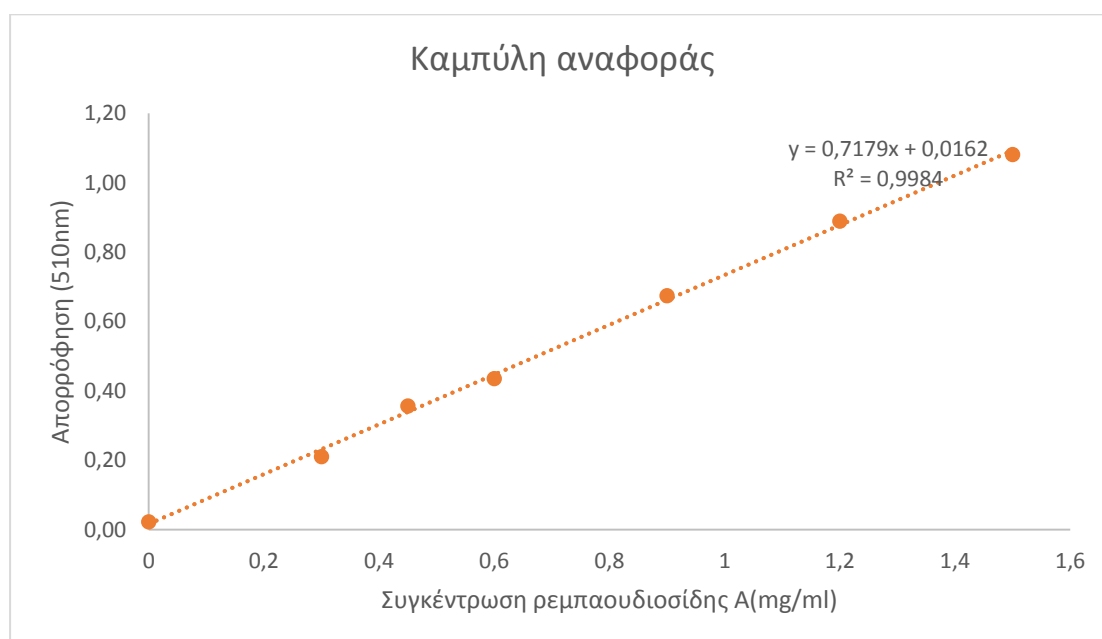
Συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης A (ppm)	Υπολογισμός ρεμπαουδιοσίδης A έπειτα από όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση (ppm)	% bias	% Υδρόλυση ρεμπαουδιοσίδης A
150	138.3	-7.8	40.7
150	145.0	-3.3	40.2
75	71.6	-4.4	41.2
75	80.0	6.7	41.1

Πίνακας 14: Αποτελέσματα προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από επώαση σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης και όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση και ποσοστό υδρόλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α σε υδατικά διαλύματα

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε πως η ρεμπαουδιοσίδη Α υδρολύθηκε σε ποσοστό περίπου 40% στα υδατικά διαλύματα σε συνθήκες όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση. Η συγκέντρωση της ρεμπαουδιοσίδης Α στα δείγματα, υπολογίστηκε με τη μέθοδο GOD/PAP έπειτα από όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση, με πολύ ικανοποιητικό ποσοστό συστηματικού σφάλματος (<10%), παρά το γεγονός ότι η υδρόλυση της ρεμπαουδιοσίδης Α ήταν χαμηλότερη από ότι στο διαλύτη ακετονιτρίλιο/ νερό 8/2 v/v.

Συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης Α (mg/ml)	Διάλυμα εργασίας εξοκινάσης (μl/ml διαλύματος)	Θευκό οξύ 10% v/v (μl/ml διαλύματος)	Απορρόφηση (510 nm)
1.50	500	150	1.081
1.20	500	150	0.889
0.90	500	150	0.674
0.60	500	150	0.435
0.45	500	150	0.356
0.30	500	150	0.210

Πίνακας 15: Αποτελέσματα προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από επώαση σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης και όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση σε υδατικά διαλύματα



Εικόνα 11: Καμπύλη αναφοράς μεταξύ της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α και του παρατηρούμενου σήματος έπειτα από επώαση των δειγμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης, όξινη υδρόλυση υπό θέρμανση και ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο GOD/PAP

Με βάση τα δεδομένα του πίνακα 16, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α έπειτα από επώαση σύμφωνα με τη μέθοδο εξοκινάσης, όξινη υδρόλυση με θέρμανση και ανάλυση με τη μέθοδο GOD/PAP. Ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης (R^2) υπολογίστηκε σε 0.9984, συνεπώς η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε, ο οποίος σε αυτή την περίπτωση είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α σε υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν και γλυκόζη. Τα αποτελέσματα της καμπύλης αναφοράς της εικόνας 11 επίσης υποδεικνύουν πως η μέθοδος της εξοκινάσης είναι κατάλληλη για τη διαχείριση δειγμάτων ρεμπαουδιοσίδης Α τα οποία επίσης περιέχουν γλυκόζη.

Στη συνέχεια, με τα δεδομένα καμπυλών αναφοράς οι οποίες κατασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου σε mg/100ml σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους:

1. $LOD = [(AVERAGE - \beta) / \alpha] + 3SD$
2. $LOQ = [(AVERAGE - \beta) / \alpha] + 10SD$

όπου, AVERAGE η μέση τιμή των μετρήσεων του τυφλού δείγματος για τη μέθοδο, SD η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του τυφλού δείγματος για τη μέθοδο, β η τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής για την καμπύλη αναφοράς και α η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Απορρόφηση blank δείγματος (652 nm)	AVERAGE=
0.020	0.023
0.028	SD=
0.022	0.004

Πίνακας 16: Τιμές απορρόφησης blank δείγματος, μέσος όρος και τυπική απόκλιση τους για τον υπολογισμό των LOD, LOQ

Με βάση τις εξισώσεις 1 και 2 της σελίδας 76 και τα στοιχεία του πίνακα 17, το LOD υπολογίστηκε πως είναι ίσο με 0.010 και το LOQ είναι 0.039.

2.5 Φωτομετρική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού σακχαρίνης

2.5.1 Υλικά

- σακχαρίνη της εταιρείας Lehmann & Voss και καθαρότητας 99-101%
- φωτόμετρο ορατού/ υπεριώδους φωτός της εταιρείας Amersham Biosciences
- χλωροφόρμιο της εταιρείας Fischer, USA και καθαρότητας analytical grade
- μπλε του μεθυλενίου
- pHμετρο της εταιρείας Consort
- γαλακτικό οξύ καθαρότητας reagent grade

2.5.2 Μέθοδος

Για το φωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της σακχαρίνης με επαλήθευση πρωτοκόλλου της βιβλιογραφίας (Sastry et al, 1995) παρασκευάστηκε stock διάλυμα σακχαρίνης συγκέντρωσης 0.1 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα γαλακτικών συγκέντρωσης 50 mM και pH 3.8. Επιπλέον, παρασκευάστηκε διάλυμα της χρωστικής μπλε του μεθυλενίου συγκέντρωσης 3.5 mg/ml σε χλωροφόρμιο. Στο pH 3.8 η σακχαρίνη και το μπλε του μεθυλενίου αποκτούν αντίθετο φορτίο και σχηματίζουν ζεύγος ιόντων. Το συγκεκριμένο ζεύγος ιόντων εκχylίζεται στο χλωροφόρμιο και προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 652 nm. Από το stock διάλυμα της σακχαρίνης παρασκευάστηκε μια σειρά αραιώσεων ώστε να διερευνηθεί η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της σακχαρίνης στο δείγμα και της απορρόφησης στα 652 nm. Οι συγκεντρώσεις και η απορρόφηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 18.

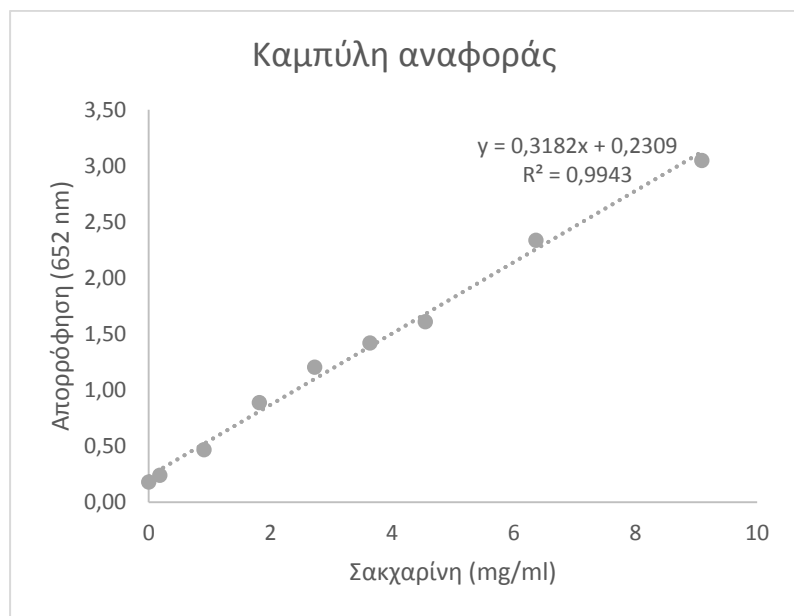
2.5.3 Αποτελέσματα

stock	Ρυθμιστικό	Τελική	Χλωροφόρμιο	Μπλε του	A652 nm
διάλυμα	διάλυμα	συγκέντρωση	(μl)	μεθυλενίου	
σακχαρίνης	γαλακτικών	σακχαρίνης		3.5 mg/ml	
0.1 mg/ml	(μl)	(mg/100ml)		(μl)	

(μl)					
10	540	0.18	500	50	0.240
50	500	0.91	500	50	0.468
100	450	1.82	500	50	0.888
150	400	2.73	500	50	1.204
200	350	3.64	500	50	1.420
250	300	4.55	500	50	1.610
350	200	6.36	500	50	2.336
500	50	9.09	500	50	3.048
0	550	0	500	50	0.180

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις σακχαρίνης και αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 18, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με σκοπό την αρχική διερεύνηση της καταλληλότητας της μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της σακχαρίνης μέσω του υπολογισμού του συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης.



Εικόνα 12: Καμπύλη αναφοράς των αρχικών αποτελεσμάτων του φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης

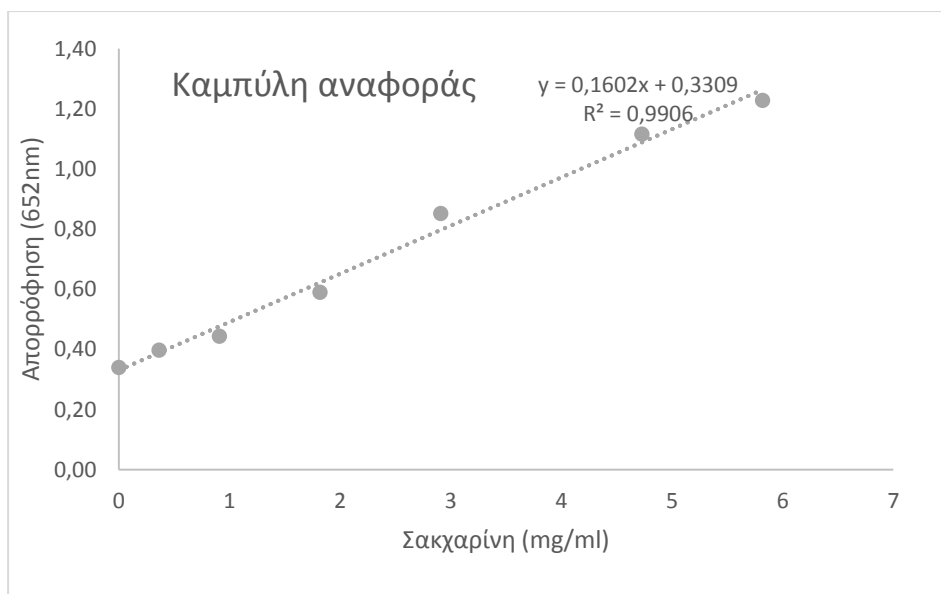
Ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης είναι μεγαλύτερος του 0.99, γεγονός που υποδηλώνει πως η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο

αναπτύχθηκε. Ωστόσο, το πείραμα επαναλήφθηκε ώστε οι τιμές απορρόφησης που λήφθηκαν να είναι μικρότερες ή ίσες του 1.2, ώστε να ισχύει ο νόμος των Lambert και Beer. Επιπλέον, η χρωστική του μπλε του μεθυλενίου δε διαλύθηκε πλήρως στο διαλύτη, συνεπώς η συγκέντρωσή της ήταν ελαφρώς χαμηλότερη από τη θεωρητική συγκέντρωση που αναφέρεται στον πίνακα 11. Από το stock διάλυμα σακχαρίνης πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές αραιώσεις και παράλληλα παρασκευάστηκε αραιότερο διάλυμα της χρωστικής από το οποίο θα προστεθεί μεγαλύτερη ποσότητα στα δείγματα σακχαρίνης.

stock διάλυμα σακχαρίνης 0.1 mg/ml (μl)	Ρυθμιστικό διάλυμα γαλακτικών (μl)	Τελική συγκέντρωση σακχαρίνης (mg/100ml)	Μπλε του μεθυλενίου 0.32 mg/ml σε χλωροφόρμιο (μl)	A652 nm
20	530	0.36	550	0.398
50	500	0.31	550	0.444
100	450	1.82	550	0.590
160	390	2.91	550	0.852
260	290	4.73	550	1.116
320	230	5.82	550	1.228
0	550	0	550	0.340

Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις σακχαρίνης και τελικά αποτελέσματα φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης

Με βάση τα αποτελέσματα του πίνακα 19, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό του συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης.



Εικόνα 13: Καμπύλη αναφοράς των τελικών αποτελεσμάτων του φωτομετρικού προσδιορισμού σακχαρίνης

Ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης είναι μεγαλύτερος του 0.99, συνεπώς η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο αναπτύχθηκε. Στη συνέχεια, με τα δεδομένα απορροφήσεων του τυφλού δείγματος υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου σε mg/100ml σύμφωνα με τους παρακάτω τύπους:

$$3. \text{ LOD} = [(\text{AVERAGE} - \beta) / \alpha] + 3\text{SD}$$

$$4. \text{ LOQ} = [(\text{AVERAGE} - \beta) / \alpha] + 10\text{SD}$$

όπου, AVERAGE η μέση τιμή των μετρήσεων του τυφλού δείγματος για τη μέθοδο, SD η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του τυφλού δείγματος για τη μέθοδο, β η τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής για την καμπύλη αναφοράς και α η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Απορρόφηση blank δείγματος (652 nm)	AVERAGE=
0.148	0.157
0.158	SD=
0.164	0.008

Πίνακας 19: Τιμές απορρόφησης blank δείγματος, μέσος όρος και τυπική απόκλιση τους για τον υπολογισμό των LOD, LOQ

Με βάση τις εξισώσεις 1 και 2 της σελίδας 80 και τα στοιχεία του πίνακα 20, το LOD υπολογίστηκε πως είναι ίσο με 0.115 mg/100ml και το LOQ είναι 0.171 mg/100ml.

2.6 HPLC μεθοδολογία προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α και σακχαρίνης

2.6.1 Υλικά

- ακετονιτρίλιο της εταιρείας Chem lab NV, Belgium και καθαρότητας HPLC grade
- υπερκάθαρο νερό της εταιρείας Chem lab NV, Belgium
- φορμικό οξύ της εταιρείας SIGMA- ALDRICH και καθαρότητας HPLC grade
- ρεμπαουδιοσίδη Α καθαρότητας 97% εταιρείας Shandong Shengxiangyuan Biotechnology
- σακχαρίνη της εταιρείας Lehmann & Voss και καθαρότητας 99-101%
- HPLC Ultimate 3000 της εταιρείας Dionex με ανιχνευτή PDA

2.6.2 Μέθοδος

Για την ανάλυση προσδιορισμού της σακχαρίνης και της ρεμπαουδιοσίδης Α πραγματοποιήθηκε HPLC ανάλυση αντίστροφης φάσης με στήλη διαστάσεων 250 x 4.6 mm και στατική φάση πορώδη σίλικα με προσδεσμεμένες ομάδες οκταδέκυλο σιλανίου. Η ροή της κινητής φάσης ορίστηκε στα 0.5 ml/ λεπτό. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 25 °C και το μήκος κύματος της ανάλυσης 210 nm. Δοκιμάστηκαν οι παρακάτω κινητές φάσεις:

1. ακετονιτρίλιο/ νερό σε αναλογία 80/20 v/v και ισοκρατική έκλυση,
2. ακετονιτρίλιο/ νερό σε αναλογία 90/10 v/v και υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 0,1% v/v, τοποθετημένα σε δύο ξεχωριστά κανάλια του χρωματογράφου και με ισοκρατική έκλυση σε αναλογία περίπου 90% από το κανάλι του οργανικού διαλύματος και 10% από το κανάλι του υδατικού διαλύματος

2.6.3 Αποτελέσματα

Παρασκευάστηκαν δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α και σακχαρίνης συγκέντρωσης 2 mg/ml σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/ νερό 6/4 v/v (χρησιμοποιήθηκε μειωμένο ακετονιτρίλιο ώστε να επιτευχθεί καλύτερο σχήμα χρωματογραφικών κορυφών, καθώς στην περίπτωση που ο οργανικός διαλύτης στο δείγμα είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι στην κινητή φάση, τότε η κορυφή «σπάει») και τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν και με τις δύο κινητές φάσεις. Αφού καθορίστηκαν οι χρόνοι ανάσχεσής τους (πίνακας 21), επιλέχθηκε η 2^η κινητή φάση ως προτιμότερη, καθώς επιτεύχθηκε καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ των δύο αναλυτών.

Αναλύτης	Κινητή φάση	Χρόνος ανάσχεσης (min)
Σακχαρίνη	1 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 82)	4.65
Ρεμπαουδιοσίδα Α	1 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 82)	7.80
Σακχαρίνη	2 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 82)	8.90
Ρεμπαουδιοσίδα Α	2 (όπως περιγράφεται στη σελίδα 82)	4.80

Πίνακας 20 : Χρόνοι ανάσχεσης αναλυτών έπειτα από ανάλυση με τις προτεινόμενες κινητές φάσεις

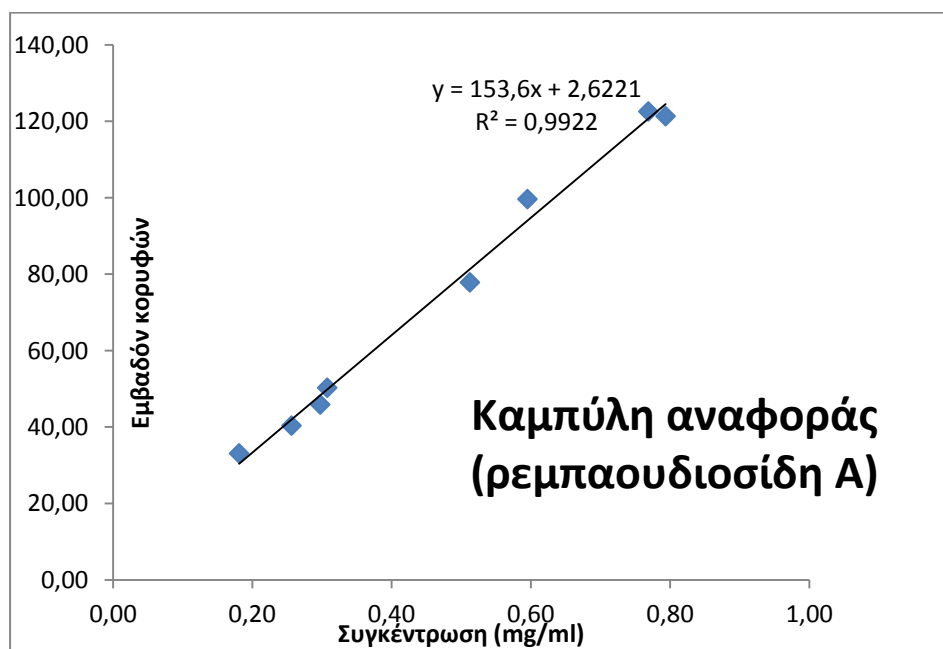
Στη συνέχεια, με ανάλυση διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων διερευνήθηκε η γραμμική συσχέτιση της συγκέντρωσης των αναλυτών και των εμβαδών των κορυφών τους.

Συγκέντρωση ρεμπαουδιοσίδης Α (mg/ml)	Εμβαδόν κορυφής ρεμπαουδιοσίδης Α	Συγκέντρωση σακχαρίνης (mg/ml)	Εμβαδόν κορυφής σακχαρίνης
0.79	121.35	0.10	628

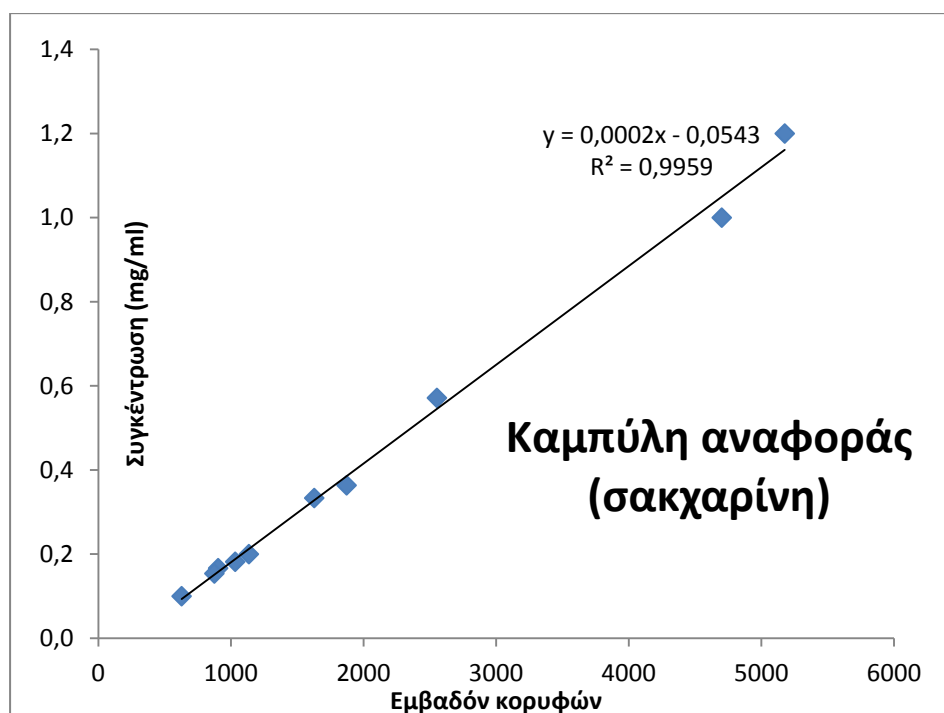
0.77	122.59	0.15	875
0.60	99.66	0.17	904
0.51	77.87	0.18	1032
0.31	50.30	0.20	1135
0.30	45.90	0.33	1628
0.26	40.38	0.36	1872
0.18	33.12	0.57	2553
(-)	(-)	1.0	4701
(-)	(-)	1.2	5176

Πίνακας 21: Αποτελέσματα χρωματογραφικής ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α και σακχαρίνης

Με βάση τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης τα οποία φαίνονται στον πίνακα 22, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για να υπολογιστεί και ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης, ώστε να διαπιστωθεί αν η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος είναι κατάλληλη για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α και της σακχαρίνης.

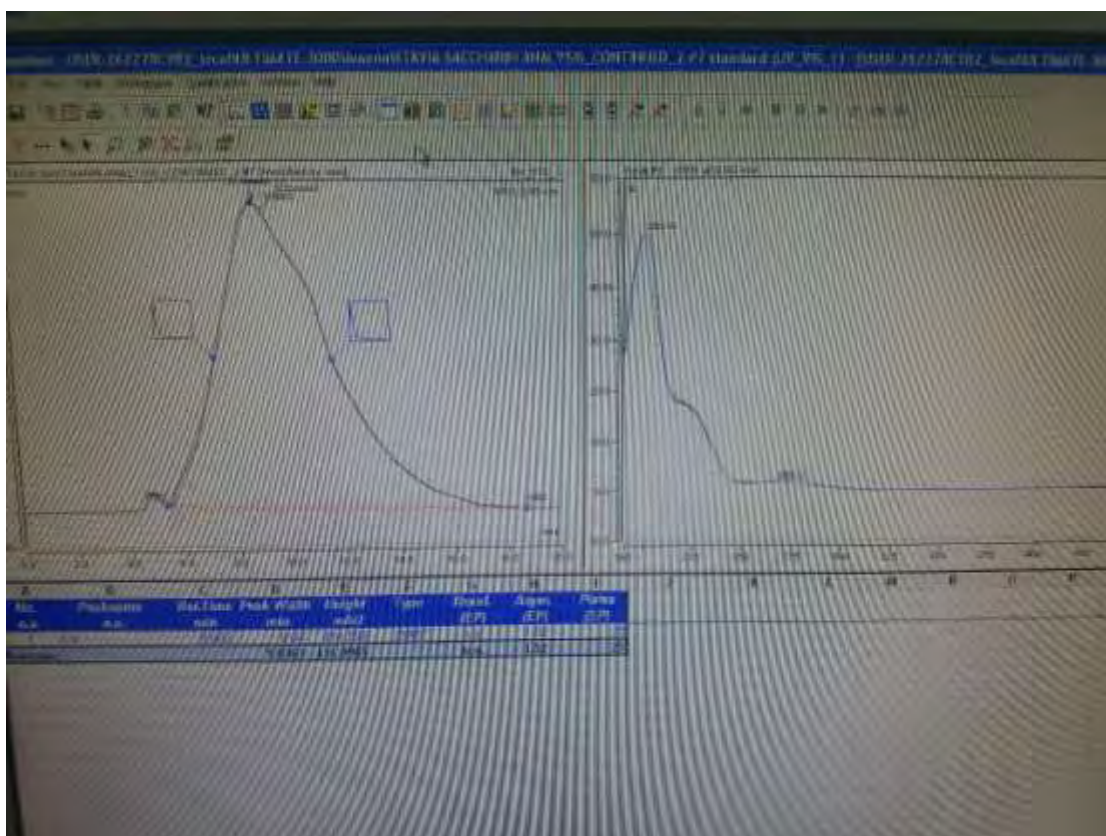


Εικόνα 14: Καμπύλη αναφοράς για τον HPLC προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α

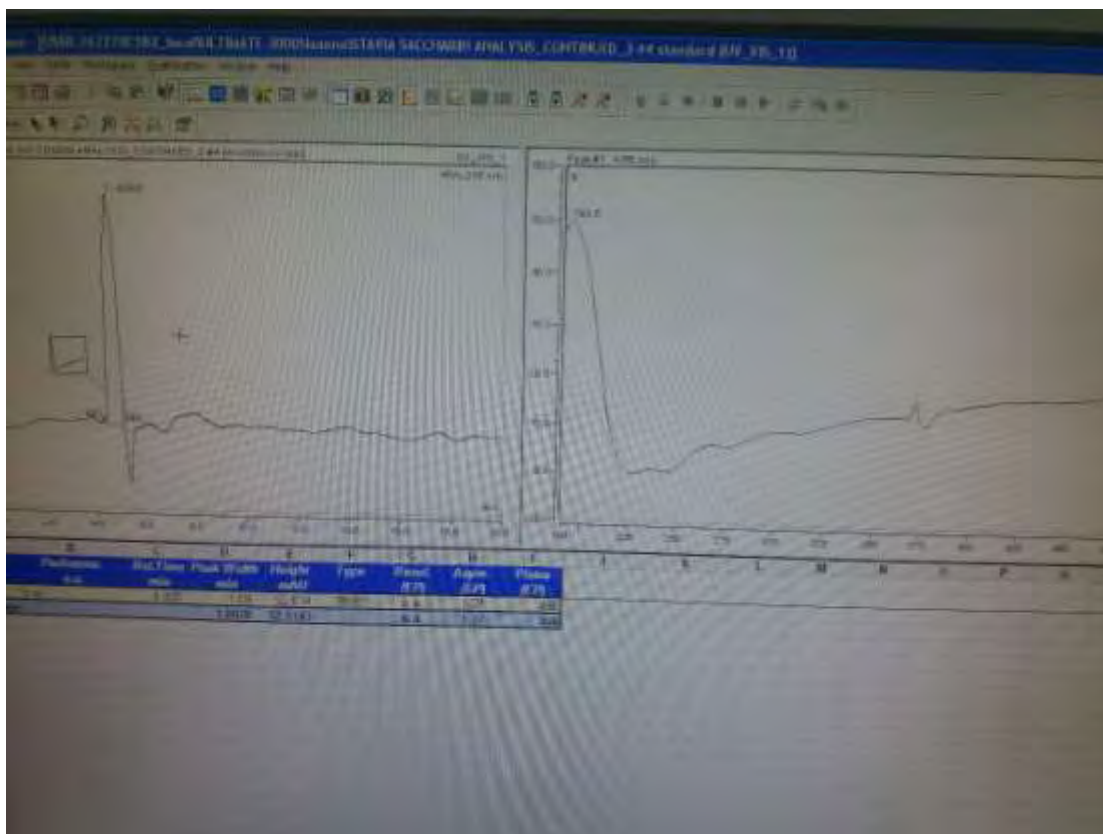


Εικόνα 15: Καμπύλη αναφοράς για τον HPLC προσδιορισμό της σακχαρίνης

Ο συντελεστής γραμμικής παλινδρόμησης είναι μεγαλύτερος του 0.99 και για τους δύο αναλύτες, συνεπώς η συγκεκριμένη μέθοδος HPLC είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ωστόσο, αν και ο διαχωρισμός των κορυφών της ρεμπαουδιοσίδης Α και της σακχαρίνης είναι ικανοποιητικός στις συγκεντρώσεις που αναλύθηκαν, είναι πιθανό να μην είναι ικανοποιητικός κατά τη διερεύνηση της νοθείας εμπορικών προϊόντων, στα οποία αναμένεται η συγκέντρωση της ρεμπαουδιοσίδης Α να είναι πολύ υψηλότερη της σακχαρίνης. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση της ρεμπαουδιοσίδης Α είναι τόσο υψηλή ώστε να οδηγήσει στην εμφάνιση διευρυμένης, αμβλείας κορυφής, η πολύ μικρότερη κορυφή της σακχαρίνης μπορεί να εκλούεται στην ουρά της κορυφής αυτής και να μη διαχωρίζεται. Αυτό είναι ένα ακόμα πλεονέκτημα της διερεύνησης της νοθείας με μη χρωματογραφικές μεθόδους, καθώς οι μη χρωματογραφικές μέθοδοι ποσοτικοποιούν τη ρεμπαουδιοσίδη Α και τη σακχαρίνη χωριστά. Στην εικόνα 17 παρουσιάζεται η χρωματογραφική κορυφή, ο χρόνος ανάλυσης και το φάσμα απορρόφησης της σακχαρίνης και στην εικόνα 18 της ρεμπαουδιοσίδης Α, έπειτα από ανάλυση με τη χρωματογραφική μέθοδο που προτείνεται.



Εικόνα 16: Αριστερά παρουσιάζεται η χρωματογραφική κορυφή της σακχαρίνης με χρόνο κατακράτησης 8.9 και δεξιά το φάσμα απορρόφησης της σακχαρίνης



Εικόνα 17: Αριστερά παρουσιάζεται η χρωματογραφική κορυφή της ρεμπαουδιοσίδης Α με χρόνο κατακράτησης 4.8 και δεξιά το φάσμα απορρόφησης της ρεμπαουδιοσίδης Α

2.8 Αποτελέσματα ανάλυσης εμπορικών προϊόντων Stevia

Έπειτα από την ανάπτυξη και επικύρωση της φωτομετρικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης Α, την επαλήθευση της φωτομετρικής μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό της σακχαρίνης, αλλά και την επαλήθευση της χρωματογραφικής μεθόδου HPLC/UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό και των δύο αναλυτών, αναλύθηκαν εμπορικά δείγματα Stevia τόσο με τη φωτομετρική όσο και με τη χρωματογραφική μέθοδο, με σκοπό την ποσοτικοποίηση της ρεμπαουδιοσίδης Α που περιέχουν και την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της φωτομετρικής μεθόδου όξινης υδρόλυσης μέσω της σύγκρισής τους με εκείνα της πρότυπης HPLC μεθόδου. Επιπλέον, τα εμπορικά δείγματα αναλύθηκαν με τη φωτομετρική μέθοδο για τον προσδιορισμό τυχόν ποσότητας σακχαρίνης που περιέχουν.

2.8.1 Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά τα οποία αναφέρονται στις ενότητες 2.6.1, 2.5.1 και 2.4.3.1.

2.8.2 Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι οι οποίες αναλύονται στις ενότητες 2.6.2, 2.5.2 και 2.4.3.2.

2.8.3 Αποτελέσματα

Εμπορική ονομασία δείγματος	Τύπος δείγματος	Ρεμπαουδιοσίδη A (% w/w or % w/v)_ Όξινη υδρόλυση	Ρεμπαουδιοσίδη A (% w/w) αναφερόμενο από τον κατασκευαστή	Bias (%)
On stevia	Πρώτη ύλη τροφίμων	17.9	17.2 (πιστοποιητικό HPLC ανάλυσης)	4.3
Tasteva	Πρώτη ύλη τροφίμων	80.3	>75 και συνολικοί γλυκοζίτες στεβιόλης>95 (πιστοποιητικό HPLC ανάλυσης)	(-)
Erylite	Πρώτη ύλη τροφίμων	0.2	Maximum 0.5% w/w	(-)
Sweete	Γλυκαντικό σε σκόνη (super market)	1.4	1.25	13
Αναψυκτικό τύπου cola	Εμπορικό προϊόν ως διάλυμα	0.004 (<LOQ)	(-)	(-)

Αντιβηχικό σιρόπι	Εμπορικό προϊόν ως διάλυμα	0.019	0.009 %w/w (φόρμουλα προϊόντος)	240
Ecostevia	Γλυκαντικό σε διάλυμα	0.31	(-)	(-)

Πίνακας 22: Αποτελέσματα φωτομετρικής ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α σε εμπορικά δείγματα

Στον πίνακα 23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της φωτομετρικής ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α ορισμένων εμπορικών δειγμάτων Stevia, με τη μέθοδο όξινης υδρόλυσης υπό θέρμανση, έπειτα από απομάκρυνση τυχόν αρχικής ποσότητας γλυκόζης από τα δείγματα με τη μέθοδο της εξοκινάσης, και φωτομετρικό προσδιορισμό της απελευθερωμένης γλυκόζης με τη μέθοδο GOD/PAP. Για τα δείγματα που ο κατασκευαστής παρέχει την προδιαγραφή σχετικά με τη συγκέντρωση της ρεμπαουδιοσίδης Α, η υπολογιζόμενη τιμή εμφανίζει συστηματικό λάθος (bias) 4.3% για το προϊόν “On Stevia” και αποτελέσματα εντός των προδιαγραφών του κατασκευαστή για τα προϊόντα “Tasteva” και “Erylite”. Για τα δείγματα τα οποία είναι σε μορφή διαλύματος, το περιεχόμενο τους σε ρεμπαουδιοσίδα Α ήταν είτε οριακά εντός ή εκτός του ορίου ποσοτικοποίησης. Η τιμή της ρεμπαουδιοσίδης Α στο αντιβηχικό σιρόπι η οποία υπολογίστηκε κοντά στο LOQ, απείχε σημαντικά από την προδιαγραφή του παραγωγού. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι το σιρόπι είχε ελαφρώς κίτρινο χρώμα και στους υπολογισμούς δε συμπεριλήφθηκε διόρθωση της συμβολής του χρώματος του αρχικού διαλύματος.

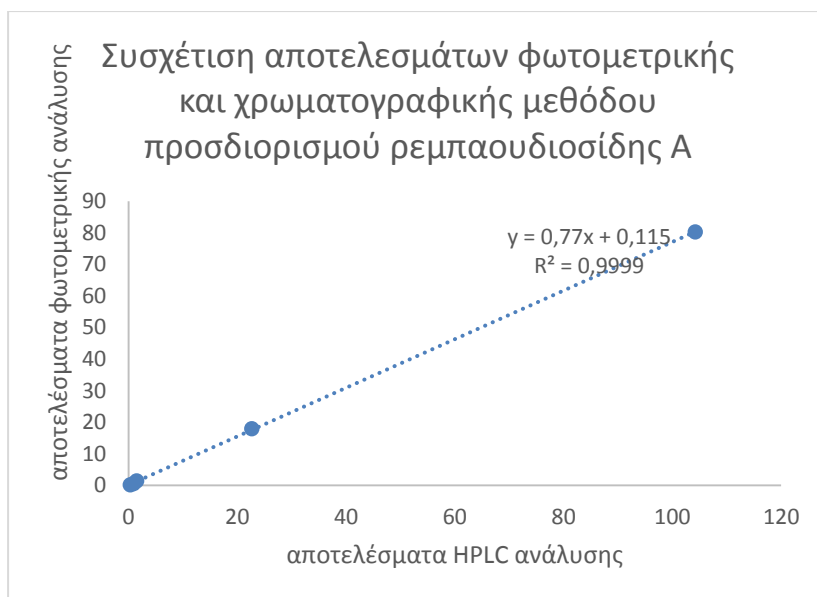
Εμπορική ονομασία δείγματος	Τύπος δείγματος	Ρεμπαουδιοσίδα Α (% w/w), HPLC ανάλυση	Ρεμπαουδιοσίδα Α (% w/w) αναφερόμενο από τον κατασκευαστή	Bias (%)
On stevia	Πρώτη ύλη τροφίμων	22.6	17.2 (πιστοποιητικό HPLC ανάλυσης)	32

Tasteva	Πρώτη ύλη τροφίμων	104.2	>75 (πιστοποιητικό HPLC ανάλυσης)	(-)
Erylite	Πρώτη ύλη τροφίμων	0.3	Maximum 0.5%	(-)
Sweete	Γλυκαντικό (super market)	1.5	1.25 %	19

Πίνακας 23: Αποτελέσματα HPLC/UV ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α εμπορικών δειγμάτων

Στον πίνακα 24 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης Α των ίδιων εμπορικών δειγμάτων Stevia. Η ανάλυση εμπορικών δειγμάτων γνωστής περιεκτικότητας σε ρεμπαουδιοσίδη Α απέδειξε τη μειωμένη ακρίβεια της μεθόδου (εκφρασμένη ως %bias), σε σχέση με τη μέθοδο της όξινης υδρόλυσης, στην ανάλυση πρώτων υλών όπου οι γλυκοζίτες Stevia είναι σημαντικά εμπλουτισμένοι σε ρεμπαουδιοσίδη Α. Στο εμπορικό δείγμα ρεμπαουδιοσίδης Α που περιείχε και σημαντική συγκέντρωση άλλων γλυκοζιτών (Tasteva) παρατηρήθηκε πολύ σημαντική υπερεκτίμηση της περιεχόμενης ρεμπαουδιοσίδης Α κατά την HPLC ανάλυση, σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη μεθοδολογία όξινης υδρόλυσης.

Με βάση τα αποτελέσματα των δύο αναλύσεων τα οποία παρουσιάζονται στους πίνακες 23 και 24, κατασκευάστηκε καμπύλη για τον υπολογισμό του συντελεστή γραμμικής παλινδρόμησης για τη συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο αναλύσεων. Δε λήφθηκε υπόψιν το δείγμα «Tasteva» που περιείχε σημαντική συγκέντρωση και άλλων γλυκοζιτών στεβιόλης. Η συσχέτιση των τιμών των δύο μεθόδων (όξινης υδρόλυσης και πρότυπης HPLC μεθόδου) με Pearson Regression Analysis ήταν θετική, γραμμική και στατιστικά σημαντική ($R:0.9811$, $N=5$, $P < 0.0031$).



Εικόνα 18: Γραμμική συσχέτιση αποτελεσμάτων φωτομετρικής και χρωματογραφικής μεθόδου προσδιορισμού ρεμπαουδιοσίδης Α

Εμπορικά δείγματα	Ρεμπαουδιοσίδη Α (%w/w ή %w/v)_ Όξινη υδρόλυση	Σακχαρίνη (% w/w)	Σακχαρίνη ως % ποσοστό
On stevia	17.94	<LOD	(-)
Tasteva	80.30	<LOD	(-)
Erylite	0.2	<LOD	(-)
Sweete	1.4	0.001	0.07
Αντιβηχικό σιρόπι	0.019	0.012	0.63
Ecostevia	0.31	2.50	12.4

Πίνακας 24: Αποτελέσματα φωτομετρικής ανάλυσης σακχαρίνης σε εμπορικά δείγματα

Τα εμπορικά δείγματα στα οποία προσδιορίστηκε ποσοτικά η ρεμπαουδιοσίδη Α, αναλύθηκαν και ως προς την περιεχόμενη σακχαρίνη, μόνο με τη φωτομετρική μέθοδο (πίνακας 25). Το γλυκαντικό “Sweete” βρέθηκε πως περιέχει σακχαρίνη σε συγκέντρωση 10^{-3} %w/w, δηλαδή σε ποσοστό χαμηλότερο της τάξης του 0.1% ως προς την περιεχόμενη ρεμπαουδιοσίδη Α. Παράλληλα, αναλύθηκαν μερικά ακόμη εμπορικά δείγματα ρεμπαουδιοσίδης Α ως προς την ύπαρξη σακχαρίνης ώστε να διερευνηθεί η πιθανότητα νοθείας τους. Σε αντιβηχικό σιρόπι με γλυκοζίτες

στεβιόλης ως διορθωτικά της γεύσης ανιχνεύθηκε σακχαρίνη σε συγκέντρωση 0.012 % w/v διαλύματος τελικού προϊόντος (0.63% ως προς ρεμπαουδιοσίδη Α) χωρίς να αναφέρεται στη σύνθεση του προϊόντος. Η φόρμουλα του προϊόντος αναφέρει ότι περιέχει σορβικό κάλιο και βενζοϊκό νάτριο (ως συντηρητικά) τα οποία πιθανότατα σχηματίζουν ζεύγος ιόντων υπό τις συνθήκες της μεθόδου δίνοντας έγχρωμο προϊόν. Τέλος, σχετικά με το προϊόν «Ecostevia» η ετικέτα του αναφέρει πως είναι μίγμα σακχαρίνης και ρεμπαουδιοσίδης Α.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός της φωτομετρικής μεθοδολογίας προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης Α με τη φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της σακχαρίνης, οι οποίες προτείνονται στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι χρήσιμος για την απλή, ανέξοδη, γρήγορη και με ικανοποιητική ακρίβεια, πρώτη διερεύνηση της νοθείας πρώτων υλών προϊόντων Stevia, με βελτιωμένα πολλά από τα τεχνικά χαρακτηριστικά σε σχέση με την εναλλακτική HPLC/UV μέθοδο. Το βασικό μειονέκτημα των μεθόδων που αναπτύχθηκαν είναι η μικρή εξειδίκευσή τους, με αποτέλεσμα να αποτελούν μέθοδο αρχικού screening και να απαιτούν περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση σε περίπτωση εντοπισμού νοθείας.

Συμπεράσματα

Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης Α, η οποία βασίζεται στην όξινη υδρόλυσή της υπό θέρμανση και τον μετέπειτα φωτομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης που απελευθερώνεται, με πρότερη απομάκρυνση τυχόν αρχικής ποσότητας γλυκόζης με κατεργασία με εξοκινάση. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης του τελικού έγχρωμου προϊόντος της ενζυματικής μετατροπής της γλυκόζης και της συγκέντρωσης της ρεμπαουδιοσίδης Α ($R^2 > 0.99$) με ευρύ εύρος γραμμικής περιοχής (0-1.5 mg/ml), χαμηλό LOQ (0.39 ppm) και ικανοποιητική ακρίβεια (bias <10% κατά την ανάλυση πρότυπων δειγμάτων). Ανάλυση εμπορικών δειγμάτων γνωστής περιεκτικότητας στο συγκεκριμένο γλυκοζίτη απέδειξε την καταλληλότητα των τεχνικών χαρακτηριστικών της μεθόδου, συμπεριλαμβανομένης της ακρίβειας της (<13 % σε κάθε περίπτωση), στην ανάλυση πρώτων υλών και, οριακά, ποτών, όπου οι γλυκοζίτες της Stevia είναι σημαντικά εμπλουτισμένοι σε ρεμπαουδιοσίδη Α. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο δεν επιτρέπει τον διαχωρισμό των επιμέρους γλυκοζιτών στεβιόλης, εξαιτίας της ομοιότητας των δομών τους, οι οποίες διαφέρουν μόνο ως

προς το βαθμό γλυκοσυλίσωσης. Σε εμπορικό δείγμα ρεμπαουδιοσίδης A που περιείχε μεγάλη συγκέντρωση και άλλων γλυκοζιτών δεν παρατηρήθηκε, παραταύτα, σημαντική υπερεκτίμηση της περιεχόμενης ρεμπαουδιοσίδης A. πιθανότατα λόγω σημαντικής παρουσίας στεβιοσίδης με λιγότερα μόρια γλυκόζης ανά μόριο γλυκοζίτη (3) σε σύγκριση με τη ρεμπαουδιοσίδη A (4).

Παράλληλα επαληθεύθηκε φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού σακχαρίνης, κοινής νοθευτικής ουσίας των προϊόντων στεβιόλης, με σκοπό τη διερεύνηση της νοθείας εμπορικών προϊόντων Stevia. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης του σχηματιζόμενου ζεύγους ιόντων και της συγκέντρωσης της σακχαρίνης ($R^2 > 0.99$) με ευρύ εύρος γραμμικής περιοχής (0-6 mg/ml), και χαμηλό LOQ (1.7 ppm). Η ακρίβεια της μεθόδου δε διερευνήθηκε λόγω έλλειψης χρόνου. Ανάλυση εμπορικού δείγματος (ecostevia) για το οποίο είναι γνωστό ότι περιέχει μείγμα ρεμπαουδιοσίδης A και σακχαρίνης αποτελεί αρχική ένδειξη της καταλληλότητας των τεχνικών χαρακτηριστικών της συνολικής προτεινόμενης μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό σακχαρίνης και ρεμπαουδιοσίδης A σε μείγμα. Εάν και η προτεινόμενη μεθοδολογία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της σακχαρίνης δεν επιτρέπει τη δυνατότητα διενέργειας ελέγχων χωρίς τη χρήση αντιδραστηρίων, και παρουσιάζει μειωμένη ειδικότητα, προσδιορίζει το νοθευτικό σε χαμηλότερες σχετικές αναλογίες ως προς τη ρεμπαουδιοσίδη A (μέχρι τουλάχιστον 0.07 %) σε σχέση με βιβλιογραφικές μεθόδους διερεύνησης νοθείας Stevia, όπως με χρήση Raman φασματομέτρου (5 %, Jentzsch et al, 2016).

Τέλος επαληθεύθηκε πρωτόκολλο HPLC/UV, ταυτόχρονης ανάλυσης ρεμπαουδιοσίδης A και σακχαρίνης. Οι δύο κορυφές διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά, ενώ παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση των εμβαδών των κορυφών των δύο αναλυτών με τη συγκέντρωσή τους ($R^2 > 0.99$ και στις δύο περιπτώσεις), ικανοποιητικό εύρος γραμμικής περιοχής (μέχρι 0.8 και 1.2 mg/ml, αντίστοιχα) και LOQ αρκετά χαμηλό, τουλάχιστον για τον προσδιορισμό της ρεμπαουδιοσίδης A στα εξεταζόμενα δείγματα. Η ανάλυση εμπορικών δειγμάτων γνωστής περιεκτικότητας σε ρεμπαουδιοσίδη A απέδειξε την μειωμένη ακρίβεια της μεθόδου (εκφρασμένη ως % bias), σε σχέση με τη μέθοδο της όξινης υδρόλυσης, στην ανάλυση πρώτων υλών όπου οι γλυκοζίτες στέβιας είναι σημαντικά εμπλουτισμένοι σε ρεμπαουδιοσίδη A. Η συσχέτιση των τιμών των δύο μεθόδων (όξινης υδρόλυσης και πρότυπης μεθόδου

HPLC) που προέκυψαν κατά την ανάλυση όλων των εμπορικών δειγμάτων, με Pearson regression analysis ήταν θετική, γραμμική και στατιστικά σημαντική ($R: 0.9811$, $N=5$, $P < 0.0031$).

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο HPLC/UV δεν επιτρέπει τον διαχωρισμό των επιμέρους γλυκοζιτών στεβιόλης, εξαιτίας της ομοιότητας των δομών τους οι οποίες διαφέρουν μόνο ως προς το βαθμό γλυκοσυλίσωσης. Έτσι σε εμπορικό δείγμα ρεμπαουδιοσίδης A που περιείχε σημαντική συγκέντρωση και άλλων γλυκοζιτών παρατηρήθηκε πολύ σημαντική υπερεκτίμηση της περιεχόμενης ρεμπαουδιοσίδης A, σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη μεθοδολογία της όξινης υδρόλυσης. Επιπλέον, με βάση τα τεχνικά χαρακτηριστικά της HPLC/UV μεθόδου, εκτιμάται ότι ο ταυτόχρονος εντοπισμός της ρεμπαουδιοσίδης A σε μεγάλη συγκέντρωση και της σακχαρίνης σε πολύ χαμηλότερη, όπως αναμένεται να συμβαίνει στα προϊόντα Stevia που περιέχουν τη σακχαρίνη ως νοθευτικό, είναι αδύνατος με την HPLC/UV μεθοδολογία, εξαιτίας της παρουσίας μεγάλης, διευρυμένης κορυφής ρεμπαουδιοσίδης A η οποία μπορεί να υπερκαλύπτει την κατά πολύ μικρότερη κορυφή της σακχαρίνης.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός της φωτομετρικής μεθοδολογίας προσδιορισμού της ρεμπαουδιοσίδης A με τη φωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού της σακχαρίνης, οι οποίες προτείνονται στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι χρήσιμος για την απλή, ανέξοδη, γρήγορη και με ικανοποιητική ακρίβεια (τουλάχιστον ως προς τη ρεμπαουδιοσίδα A), πρώτη διερεύνηση της νοθείας πρώτων υλών προϊόντων Stevia, με βελτιωμένα πολλά από τα τεχνικά χαρακτηριστικά σε σχέση με την εναλλακτική HPLC/UV μέθοδο. Το βασικό μειονέκτημα των μεθόδων που αναπτύχθηκαν είναι η μικρή ειδικότητά τους, με αποτέλεσμα να αποτελούν μέθοδο αρχικού screening και να απαιτούν περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση σε περίπτωση εντοπισμού νοθείας.

Βιβλιογραφία

1. Abdullateef, R. a. Osman. M., 2012. Studies on effects of pruning on vegetable traits in *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae). *Int. J. Biol.*, pp. 146-153.
2. Abudula, R. Jeppesen. P. Rolfsen. S. Xiao. J. a. Hermansen. K., 2004. Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: Studies on the dose-, glucose- and calcium-dependency. *Metabolism*, pp. 1378-1381.
3. Allam, A. Nassar. A. a. Besheite. S., 2001. Nitrogen fertilizer requirement of *Stevia rebaudiana* Bertoni under Egyptian condition. *Egyptian J. Agric. Res.*, pp. 1005-1018.
4. Anniesremedy.com. (2019). *Stevia Sweet Leaf Benefits*. [online] Available at: <https://www.anniesremedy.com/stevia-rebaudiana.php> [Accessed 4 Jan. 2019].
5. Anton, S. Martin. C. Han. H. Coulon. S. Cefalon. W. Geiselman. P. a. Williamson. D., 2010. Effects of stevia, aspartame and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, pp. 37-43.
6. Awey, H. Massoud. M. a. El-Magrabi. S., 2011. Long- term feeding effect of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats. *Journal of Applied Toxicology*, pp. 431-438.
7. Aze, Y. Toyoda. K. Imaida. K. Hayashi. S. Imazawa. T. Hayashi Y. a. Takahasi. M., 1991. Subchronic oral toxicity study of Stevioside in F344 rats. *Eisei Shikenjo Hokoku Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, pp. 048-054.

8. Bergs, D. Burghoff. B. Joehnck. Martin M. G. a. Schembecker G., 2012. Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal Verbraucherschutz Lebensmittelsicherheit*, pp. 147-154.
9. Brandle, B. a. Telmer. P., 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, pp. 1855-1863.
10. Brusick, D., 2008. A critical review of the genotoxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 083-091.
11. Caracostas, M. Curry. L. Boileau. A. a. Brusick. D., 2008. Overview: the history, technical function, and safety of rebaudioside , a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem. Toxicol.*, pp. 1-10.
12. Catharino, R. a. Santos. L., 2012. On- line monitoring of stevioside sweetener hydrolysis to steviol in acidic aqueous solutions. *Food Chemistry*, 15 August, pp. 1632-1635.
13. Chan, P. T. B. C. Y. L. J. H. M. a. C. J., 2000. A double- blind placebo- controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, pp. 215-220.
14. Chatsudthipong, V. a. M. C., 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol. Ther.*, pp. 41-54.

15. Chaturvedula, V. a. M. S., 2015. Controlled hydrolysis studies of the diterpene glycosides rebaudioside D and rebaudioside E of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, pp. 56-62.
16. Chaturvedula, V. a. P. I., 2011. Acid and Alkaline Hydrolysis Studies of Stevioside and Rebaudioside A. *Journal of Applied and Pharmaceutical Science*, pp. 104-108.
17. Chaturvedula, V. C. S. Y. O. a. M. G., 2013. Isolation, NMR Spectral Analysis and Hydrolysis Studies of a Hepta Pyranosyl Diterpene Glycoside from *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *Biomolecules*, 3 December, pp. 733-740.
18. Chen, T. C. S. C. P. C. Y. Y. H. a. C. J., 2005. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia Rebaudiana*. *Planta Med.*, pp. 108-113.
19. Curry, L. R. A. a. B. N., 2008. Rebaudioside A: two- generation reproductive study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 021-030.
20. Das, S. D. A. M. R. P. I. N. M. a. K. A., 1992. Evaluation of cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Res.*, pp. 363-366.
21. Debnath, M., 2008. Clonal prepagation and microbial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *J. Med. Plant Res.*, pp. 045-051.
22. Deshmukh, S. a. K. V., 2014. Isolation, purification and characterization of sweeteners from *Stevia rebaudiana* Bertoni for the anti-cancerous activity

- against colon cancer. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, pp. 1394-1410.
23. Geuns, J. B. J. V. A. a. T. E., 2007. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental Biology and Medicine*, pp. 164-173.
 24. Goyal, S. S. G. R., 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a biosweetener: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, pp. 1-10.
 25. Gregersen, S. J. P. H. J. a. H. K., 2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, pp. 073-076.
 26. Grenby, T., 1997. Dental aspects of the use of sweeteners. *Pure Applied Chem.*, pp. 709-714.
 27. Gupta, E. P. S. S. S. T. T. a. R. G., 2016. Stevioside and rebaudioside A- predominant ent-kaurene diterpene glycosides of therapeutic potential- a review. *Czech Journal of Food Science*, pp. 281-299.
 28. Hagiwara, A. F. S. K. M. S. M. a. I. N., 1984. Effects of the three sweeteners on rats urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Gann Japanese Journal of Cancer Research*, pp. 763-768.
 29. Hanson, J. a. W. A., 1968. Studies in terpenoid bio- synthesis II: The biosynthesis of steviol. *Phytochemistry*, pp. 595-597.
 30. Hata, S. Y. T. a. F. S., 2001. Breeding of triploid plants of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) with high rebaudioside A content. *Jpn. J. Trop. Agric.*, pp. 281-289.

31. Helliwell, C. P. A. P. W. a. D. E., 1999. Arabidopsis ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, pp. 507-510.
32. Humphrey, T. R. A. M. R. a. B. J., 2006. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. *Plant Molecular Biology*, pp. 47-62.
33. Hutapea, A. T. C. B. D. W. P. a. G. T., 1997. Digestion of stevioside, a natural sweetener, by various digestive enzymes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, pp. 177-186.
34. JECFA, 2005. *Evaluation of certain food additives*, Geneva, Switzerland: Sixty- Third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series No. 928.
35. JECFA, 2016. *STEVIOLE GLYCOSIDES Chemical and Technical Assessment*. s.l., s.n.
36. JECFA, 2017. Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Residue Monograph prepared by the 84th meeting of JEFCA* .
37. Jentzsch, P. T.-V. S. M.-B. S. R. L. a. C. V., 2016. Detection of counterfeit stevia products using a handheld Raman spectrometer. *Vibrational Spectroscopy*, pp. 126-131.
38. Jeppesen, P. G. S. A. K. a. H. K., 2002. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonistic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki rats. *Phytomedicine*, pp. 9-14.

39. Jeppesen, P. G. S. P. C. a. H. K., 2000. Stevioside acts directly on pancreatic β -cells to secrete insulin; Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate- sensitive K ions- channel activity. *Metabolism- Clinical and Experimental*, pp. 208-214.
40. Jeppesen, P. G. S. R. S. J. M. C. M. A. A. X. J. K. M. O. T. a. H. K., 2003. Antihyperglycemic and blood- pressure reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kazikaki rat. *Metabolism- Clinical and Experimental*, pp. 372-378.
41. Khoo, V., 2017. MOH Malaysia to take legal action against maker of fake stevia products. *MIMS Today*, 02 May.
42. Kim, K. S. Y. a. S. H., 1996. Hydroxylation of ent-kaurenoic acid to steviol in *Stevia Rebaudiana* Bertoni- purification and partial characterisation of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, pp. 223-230.
43. Kinghorn, A. a. S. D., 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. *Economics and Medicinal Plant Research*, pp. 1-52.
44. Kinghorn, A. C. Y. P. L. a. Z. J., 2010. Natural Products as Sweeteners and Sweetness Modifiers. In: *Comprehensive Natural Products II*. s.l.:Chemistry and Biology, pp. 269-315.
45. Klongpanichpak, S. T. P. T. C. A. S. a. G. T., 1997. Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100. *Journal of Medical Association of Thailand (Supplement 1)*, pp. 121-128.

46. Konoshima, T. a. T. M., 2002. Cancer- chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. *Pure Applied Chem.*, pp. 1309-1316.
47. Konoshima, T. a. T. M., 2002. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. *Pure and Applied Chemistry*, pp. 1309-1316.
48. Koubaa, M. R.-S. E. Z. J. J. A. B. M. G. N. B. N. a. B. F., 2015. Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 6835-6846.
49. Koyama, E. K. K. O. Y. I. O. K. K. a. F. A., 2003. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, *Stevia* mixture and enzymatically modified *Stevia* in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 359-374.
50. Lenggong, Z., 2017. STEVIA CASE. *Pressreader*, 28 April.
51. Mantovaneli, I. F. E. S. M. a. D. S. F., 2004. The effect of temperature and flow rate on the clarification of the aqueous *Stevia* extract in a fixed-bed column with zeolites. *Braz. J. Chem. Eng.*, pp. 449-458.
52. Marcinek, K. a. K. Z., 2015. *Stevia rebaudiana* Bertoni- Chemical composition and functional properties. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, 14 2, pp. 145-152.
53. Masuda, T. Y. D. M. T. S. Y. Y. H. T. Y. a. Y. T., 2006. Identification of antioxidative compounds from *Stevia* (*Stevia rebaudiana*). *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, pp. 597-602.

54. Mathur, B. P. a. S., 2017. Critical Review on Steviol Glycosides: Pharmacological, Toxicological and Therapeutic Aspects of High Potency Zero Caloric Sweetener. *International Journal of Pharmacology*, July, pp. 916-928.
55. Matono, Y. R. A. M. S. a. R. S., 2018. Degradation study of stevioside using RP- HPLC and ESI- MS/MS. *Special Issue on Chromatography and Other Analytical Techniques*, pp. 138-141.
56. Matsui, M. M. K. K. Y. O. Y. N. T. K. Y. S. M. H. M. N. T. Y. K. I. J. a. S. T., 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*, pp. 573-579.
57. Medon, P. P. J. H.-B. J. N.-. a. N. S. D. a. K. S., 1982. *Safety assessment of some Stevia rebaudiana sweet principles in abstracts of papers 66th Annual Meeting*. New Orleans, Louisiana Federation Proceedings.
58. Melis, M., 1999. Effects of chronic administration of Stevia rebaudiana on fertility in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, pp. 157-161.
59. Milagre, H. M. L. a. T. J., 2009. Novel agents for enzymatic and fungal hydrolysis of stevioside. *Braz. J. Microbiol.*, pp. 367-372.
60. Mizushima, Y. A. T. U. M. H. Y. M.-N. C. K. A. T. T. S. F. a. Y. H., 2005. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. *Life Sciences*, pp. 2127-2140.
61. Mori, N. S. M. T. M. S. K. a. T. T., 1981. Effects of stevioside on fertility in rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, pp. 409-414.

62. Morlock, G. M. S. Z. B. a. R. J., 2014. High- performance thin- layer chromatography analysis of Steviol glycosides in Stevia formulations and sugar- free food products, and benchmarking with (ultra) high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11 July, pp. 102-111.
63. Nabors, L., 2001. In: *Alternative sweeteners*. New York: CRC Press, p. 502.
64. Nakajima, 2000a. Chromosome aberration assay of Rebaudioside A in cultured mammalian cells. Test Number 5001. *Unpublished report of a study conducted at the Biosafety Research center of Japan, submitted to WHO by the Ministry of Health and Welfare of Japan* , pp. 079-085.
65. Nakajima, 2000b. Micronucleus test of Rebaudioside A in mice. Test Number 5002. *Unpublished report of a study conducted at the Biosafety Research Center of Japan, submitted to WHO by the Ministry of Health and Welfare of Japan* , pp. 079-086.
66. Nakamura, Y. S. S. a. T. K., 1995. Suppression of synthesis of high molecular weight non-muscle tropomyosins in macrophages. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, pp. 273-282.
67. Papadopoulos, V. (2019). *Σάκχαρο GOD-PAP / BIOSIS*. [online] Biosis.com.gr. Available at: <http://www.biosis.com.gr/gr/reagents/biochemical/glupap> [Accessed 5 Jan. 2019].
68. Papadopoulos, V. (2019). *Σάκχαρο Εξοκινάση | BIOSIS*. [online] Biosis.com.gr. Available at:

- <http://www.biosis.com.gr/gr/reagents/biochemical/gluhk> [Accessed 5 Jan. 2019].
69. Papadopoulos, V. (2019). *Σάκχαρο Εξοκινάση | BIOSIS*. [online] Biosis.com.gr. Available at: <http://www.biosis.com.gr/gr/reagents/biochemical/gluhk> [Accessed 8 Jan. 2019].
70. Pariwat, P. H. S. M. C. a. C. V., 2008. A natural plant- derived dihydroisosteviol prevents cholera toxin- induced intestinal fluid secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, pp. 798-805.
71. Paul, S. S. S. B. T. a. B. K., 2012. Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutrition and Cancer*, pp. 1087-1094.
72. Pezzuto, J. C. C. S. S. N. N. a. K. A., 1985. *Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic*. s.l., National Academy of Sciences of the United States of America.
73. Phillips, K., 1987. Stevia: Steps in developing a new sweetener. In: Grenby, ed. *Developments in sweeteners*. New York: s.n., pp. 1-5.
74. Planas, G. a. K. J., 1968. Contraceptive properties of Stevia rebaudiana. *Science*, p. 1007.
75. Pol, J. H. B. a. H. T., 2007. Characterization of Stevia rebaudiana by comprehensive two- dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, pp. 85-92.

76. Prakash, I. C. V. a. M. A., 2014. Structural Characterization of the Degradation Products of a Minor Natural Sweet Diterpene Glycoside Rebaudioside M under Acidic Conditions. *Int. J. Mol. Sci.*, 15 January, pp. 1014-1025.
77. Prakash, I. M. A. a. B. C., 2014. Development of Next Generation Sweet Sweetener: Rebaudioside M. *Foods*, pp. 162-175.
78. [Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. \(2019\). Steviol. \[online\] Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/452967#section=2D-Structure \[Accessed 4 Jan. 2019\].](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/452967#section=2D-Structure)
79. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2019). *Saccharin sodium anhydrous*. [online] Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/saccharin_sodium#section=Top [Accessed 5 Jan. 2019].
80. Rajasekaran, T. R. A. U. S. K. G. P. a. R. G., 2008. Analysis of predominant steviosides in *Stevia rebaudiana bertonii* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Biotechnology*, pp. 179-188.
81. Ramesh, K. S. V. a. M. N., 2006. Cultivation of stevia (*Stevia rebaudiana*): A comprehensive review. *Adv. Agron.*, pp. 138-179.
82. Renwick, A. a. T. S., 2008. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 70-74.
83. Richman, A. G. M. S. A. Y. Z. a. B. J., 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana* recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant J.*, pp. 411-421.

84. Roberts, A. a. R. A., 2008. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside and steviol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 31-39.
85. Salvador, R. S. M. a. P. L., 2014. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as a natural sweetener and its use in health benefit. *Scientia Agropecuaria*, pp. 157-163.
86. Sastry, C. S. K. P. K. a. K., 1995. Rapid, Routine Method for the Analysis of the Non- nutritive Sweeteners in Foodstuffs. *Analyst*, June, pp. 1793-1797.
87. Sekihashi, K. S. H. a. S. Y., 2002. Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *The Journal of Toxicological Sciences*, pp. 01-08.
88. Shibata, H. S. S. O. H. N. S. a. Y. M., 1991. Glucosylation of steviol and steviol-glycosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiology*, pp. 152-156.
89. Shivanna, N. N. M. K. F. a. K. V., 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia Rebaudiana*. *Diabetes Complications*, pp. 103-113.
90. Shock, C., 1982. Natural non- caloric sweeteners. *California Agric.*, pp. 04-05.
91. Shyu, Y. L. S. L. H. W. W. a. S. C., 1994. Effects of harvesting dates on the characteristics, yield and sweet components of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) lines. *J. Agric. Res.*, pp. 029-039.

92. Slotter, E., 2008. Oral (Gavage) Study of Chrysanta 99-P on Embryo/Fetal Development in Rats. Study Number WIL-568004. *Unpublished report of WIL Research Laboratories LLC.*
93. Sreedhar, R. V. L. T. R. B. N. N. M. a. R. G., 2008. Direct organogenesis from leaf explants of Stevia Rebaudiana and cultivation in bioreactor. *Biologia Plantarum*, pp. 355-360.
94. [Stothart, C. \(2019\). Stevia rebaudiana Bertoni - ppt video online download.](#)
[\[online\] Slideplayer.com. Available at: http://slideplayer.com/slide/3833793/](#)
[\[Accessed 3 Jan. 2019\].](#)
95. Stoyanova, S. G. J. H. E. a. V. d. E. W., 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, pp. 207-214.
96. Suttajit, M. V. U. M. U. a. B. D., 1993. Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from stevia rebaudiana Bertoni. *Environmental Health Perspectives (Supplement)*, pp. 053-056.
97. Takahashi, K. S. Y. Y. I. H. T. S. T. K. M. O. T. a. K. M., 2012. Stevioside enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, pp. 243-249.
98. Takanaka, T. K. K. U. M. a. S. K., 1991. A teratological study of stevioside administered orally to rats. *Unpublished report from Department of Pharmacology, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Japan.*

99. Takasaki, M. K. T. K. M. T. H. T. J. N. H. M. M. M. K. a. L. K., 2009. Cancer preventive agents. Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, pp. 600-605.
100. Toyoda, K. M. H. S. T. U. C. T. K. a. T. M., 1997. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 597-603.
101. Urban, J. C. M. a. B. D., 2013. Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient?. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 386-390.
102. Usami, M. S. K. K. K. T. M. a. O. Y., 1995. Teratogenicity study of stevioside in rats. *Eisei Shikenko Hokoku- Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, pp. 031-035.
103. Wanke, M. T. K. a. S. E., 2001. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-d-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochimica Polonica*, pp. 663-672.
104. Who.int. (2018). *Diabetes*. [online] Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> [Accessed 30 Dec. 2018].
105. Who.int. (2018). *Obesity and overweight*. [online] Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [Accessed 30 Dec. 2018].
106. Williams, L. a. B. G., 2009. Genotoxicity studies on a high purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 1831-1836.

107. Wingard, R. B. J. E. F. D. J. H. R. a. S. C., 1980. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia*, pp. 519-520.
108. Wolwer- Rieck, U., 2018. *Steviol Glycosides: Cultivation, Processing, Analysis and Applications in Food*. 102-104 ed. s.l.:Royal Society of Chemistry.
109. Xiao, J. a. H. K., 2005. The mechanism underlying the insullinotropic effect of stevioside- activation of acetyl- CoA carboxylase. *Diabetes*, p. 131.
110. Xili, L. C. B. E. X. R. S. Y. W. H. S. a. Z. H., 1992. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of stevioside in rats. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 957-965.
111. Yadav, A. S. S. D. D. a. A. P., 2011. A review on the improvement of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Can. J. Plant Sci.*, pp. 01-27.
112. Yadav, S. a. G. P., 2012. Steviol glycosides from Stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 988-998.
113. Yamada, A. O. S. N. T. a. S. M., 1985. Chronic toxicity study of dietary Stevia extracts in F344 rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, pp. 169-183.
114. Yasukawa, K. K. S. a. S. S., 2002. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two stage

carcinogenesis in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, pp. 1488-1490.

115. Yodyingyard, V. a. B. S., 1991. Effect of stevioside on growth and reproduction. *Human Reproductions*, pp. 158-165.

116. Zhang, S. K. A. a. K. O., 2000. Membrane- based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. *Food Res. Int.*, pp. 617-620.